

Ч. Кантор/П. Шиммел

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ/3





BIOPHYSICAL CHEMISTRY

Part III

The Behavior of Biological Macromolecules

Charles R. Cantor
Columbia University

Paul R. Schimmel
Massachusetts Institute of
Technology

W. H. Freeman and Company

San Francisco

Ч.Кантор, П.Шиммел

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В трех томах

Том 3

Перевод с английского

под редакцией

д-ра хим. наук А. А. Богданова,

д-ра физ.-мат. наук Ю. С. Лазуркина,

д-ра физ.-мат. наук М. Д. Франк-Каменецкого

МОСКВА «МИР» 1985

ББК 28.072

К 19

УДК 577

Кантор Ч., Шиммел П.

К 19 Биофизическая химия: В 3-х т. Т. 3. Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 536 с., ил.

В трехтомном издании, написанном учеными США, на самом современном уровне изложены основные представления о биологических макромолекулах и методах исследования их структуры и функций. В третьем томе приведены материалы по термодинамике и кинетике взаимодействия биополимеров друг с другом и с низкомолекулярными лигандами, основам ферментативного катализа, регуляции биологической активности биополимеров, конформационным превращениям нуклеиновых кислот и белков, а также по динамике мембранных структур. Книга написана ясно и четко, на очень высоком научном уровне.

Предназначена для биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов, физиков, химиков, для преподавателей, аспирантов и студентов биологических специальностей.

К 2001040000—296
041(01)—84 св. пл. подп. изд-е, 83, ч. 1

ББК 28.072
57.04

Редакция литературы по биологии

© 1980 by W. H. Freeman and Company

© Перевод на русский язык, «Мир», 1985

ПОВЕДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Первые два тома были посвящены главным образом структуре биологических макромолекул (т. 1) и существующим методам исследования их структуры и поведения (т. 2). В третьем томе мы рассмотрим, как связаны между собой структура и поведение макромолекул и каковы механизмы, лежащие в основе биологического функционирования. Физиологическая функция белков и нуклеиновых кислот обычно осуществляется через их взаимодействия со специфическими лигандами; гл. 15, 16 и 17 посвящены рассмотрению равновесных и кинетических аспектов взаимодействий макромолекул с лигандами, включая (в гл. 17) обсуждение механизмов регуляции, влияющих на биологическую активность. Многие выводы справедливы применительно к взаимодействиям любых биологических макромолекул, хотя в большинстве приводимых здесь примеров рассматриваются белковые системы.

После этого мы перейдем к рассмотрению конформационного поведения биологических полимеров. В частности, гл. 18 посвящена конформационной статистике полимеров, основное внимание при этом уделяется статистике полипептидных цепей при использовании различных конформационных моделей последних. В гл. 19 в общих чертах показано, как на основе изучения гидродинамических свойств двухцепочечной ДНК в растворе мы приходим к выводу о том, что она представляет собой червеобразную цепь, свернутую в клубок. В гл. 20 и 21 мы рассмотрим конформационные изменения в белках и полипептидах, в том числе хорошо изученный переход спираль — клубок в полипептидах (гл. 20) и вопрос об обратимом свертывании белковых цепей (гл. 21).

В гл. 22—24 опять главным предметом обсуждения оказываются нуклеиновые кислоты. Здесь мы рассмотрим взаимодействие их с лигандами, конформационные изменения и организацию третичной структуры некоторых нуклеиновых кислот. Часть этих тем пересекается с темами предшествовавших глав, где основное внимание было уделено белкам и полипептидам. Книгу заключает гл. 25, посвященная в основном важной теме равновесий в системах, разделенных мембранами, а также структуре и функционированию липидных бислоев.

Конечно, большая доля материала третьего тома тесно связана с тем, что уже обсуждалось в первом и втором томах. В ряде мест мы ссылаемся на предыдущие главы. Однако при чтении этого тома значительная доля изложенного в ней материала не требует предварительного знакомства с остальными двумя томами; достаточно, если читатель будет обращаться за разъяснениями к соответствующим разделам предыдущих глав в тех случаях, когда в этом возникнет необходимость.

Глава 15 Взаимодействие макромолекул с лигандами в условиях равновесия

15.1. Важность взаимодействия макромолекул с лигандами

Большое разнообразие физиологических процессов является отражением взаимодействия лигандов с макромолекулами, особенно с белками. В первую очередь сюда относятся взаимодействия ферментов с их субстратами и другими молекулами, в результате которых изменяется ферментативная активность. Кроме того, существуют взаимодействия между гормонами и их рецепторами, между малыми молекулами и белками, участвующими в активном транспорте этих малых молекул, взаимодействия ионов с нуклеиновыми кислотами и белками, и т.д. Ясно, что фактически все биологические явления связаны с взаимодействиями макромолекул с лигандами, и не удивительно, что множество биохимических и биофизических исследований направлено на всестороннее изучение этих взаимодействий.

Мы рассмотрим сначала статистические основы процесса связывания, с тем чтобы иметь возможность проанализировать и понять принципиальные свойства равновесных систем, в которых происходит связывание лигандов. Наряду с общими соображениями, применимыми к любой равновесной системе, мы встретимся и с множеством особенностей, таких, как взаимодействие связывающих центров и кооперативность, взаимоотношения между двумя различными лигандами при связывании с одной макромолекулой, статистические осложнения при связывании лигандов с линейными кристаллоподобными структурами.

В этой главе рассматриваются общие свойства связывания лигандов в условиях равновесия. В гл. 16 изложены кинетические аспекты связывания лигандов. Кроме того, в гл. 16 и 17 обсуждаются некоторые специальные вопросы, важные с биохимической точки зрения. Сюда относятся ферментные системы (гл. 16), а также регуляторные процессы (гл. 17), называемые обычно аллостерическими взаимодействиями. Анализ некоторых из этих вопросов проводится на основе теоретических принципов, изложенных в данной главе.

15.2. Равновесное связывание лигандов с макромолекулами

МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ

Прежде чем рассматривать связывание лигандов с многочисленными центрами макромолекул, обсудим кратко различие между микроскопическими и макроскопическими константами равновесия. Рассмотрим это на конкретном примере титрования глицина, который можно считать двухосновной аминокислотой. Обозначим формы глицина, содержащие два протона, один протон и не содержащие ни одного протона, соответственно через GH_2^+ , GH и G^- , тогда макроскопические равновесия можно записать следующим образом:



Две макроскопические константы диссоциации определяются соотношениями

$$K_1 = (\text{GH})(\text{H}^+)/(\text{GH}_2^+) \quad (15.2a)$$

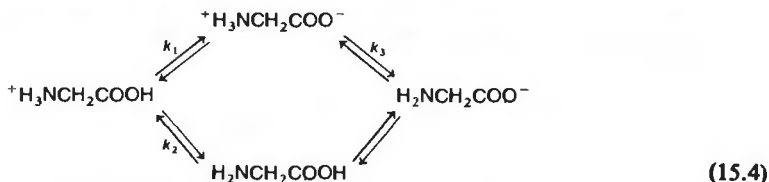
$$K_2 = (G^-)(H^+)/(\text{GH}) \quad (15.26)$$

Из данных по титрованию глицина можно получить значения двух pK ; экстраполированные к нулевой ионной силе, эти значения составляют $pK_1 = 2,35$ и $pK_2 = 9,78$ (при 25°C).

Рассмотрим теперь *микроскопические* состояния глицина в процессе титрования. Глицин в растворе может существовать в четырех формах:



для каждой из которых можно записать микроскопическое равновесие ионизации



где k_i — микроскопические константы диссоциации. Из уравнений (15.2) и (15.3) получаем

$$\begin{aligned}
 K_1 &= [({}^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COO}^-) + (\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH})](\text{H}^+)/({}^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COOH}) \\
 &= k_1 + k_2 \quad (15.5a)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 K_2 &= (\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-)(\text{H}^+)/[({}^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COO}^-) + (\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH})] \\
 &= 1/(k_3^{-1} + k_4^{-1}) \quad (15.5b)
 \end{aligned}$$

Уравнения (15.5) показывают взаимосвязь, существующую между микроскопическими и макроскопическими константами диссоциации.

Четыре микроскопические константы диссоциации не являются независимыми величинами и связаны в данном случае следующим соотношением

$$k_1 k_3 = k_2 k_4 \quad (15.6)$$

Справедливость уравнения (15.6) легко проверить; оно является прямым следствием выполнения условия материального баланса. Уравнения (15.5) и (15.6) дают три соотношения, в которые входят четыре микроскопические константы. Четвертое соотношение можно получить, предположив, что k_2 имеет то же значение, что и единственная константа диссоциации в случае метилового эфира глицина (${}^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 + \text{H}^+$). Это предположение приводит к значению $pK_2 = 7,7$. Используя значения pK_1 и pK_2 , определенные ранее, и уравнения (15.5) и (15.6), легко рассчитать, что $pK_1 = 2,35$, $pK_3 = 9,78$ и $pK_4 = 4,43$. На основании этих значений pK_i можно заключить, каким путем преимущественно протекает диссоциация — изображенным сверху или внизу на схеме (15.4).

Этот конкретный пример наглядно иллюстрирует физический смысл микроскопических и макроскопических констант и их взаимосвязь. В качестве второго примера обсудим случай, когда проявляются *статистические эффекты*. Рассмотрим молекулу А, которая имеет два эквивалентных центра связывания специфического лиганда. Например, А может быть дикарбоновой кислотой с длинной алифатической цепью, у которой микроскопическая константа диссоциации каждой карбоксильной группы имеет одно и то же значение

и не зависит от ионизационного состояния другой группы. Это условие выполняется, если алифатическая цепь является достаточно длинной и, следовательно, можно пренебречь электростатическим взаимодействием между двумя карбоксильными группами. В этом случае можно записать следующие макроскопические равновесия:

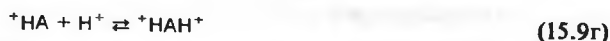


и макроскопические константы диссоциации

$$K_1 = (A)(H^+) / (A(H^+)_1) \quad (15.8a)$$

$$K_2 = (A(H^+)_1)(H^+) / (A(H^+)_2) \quad (15.8b)$$

Микроскопические равновесия можно представить схематически таким образом:



где микроскопические константы диссоциации одинаковы для всех стадий. Чтобы отразить различие между микроскопическими формами, на схеме один центр ионизации обозначен слева, а второй — справа от A. Макроскопические формы определяются через микроскопические следующим образом:

$$A = A \quad (15.10a)$$

$$A(H^+)_1 = AH^+ + {}^+HA \quad (15.10b)$$

$$A(H^+)_2 = {}^+HAN^+ \quad (15.10b)$$

Из уравнений (15.8) — (15.10) получаем, что

$$K_1 = k/2 \quad (15.11a)$$

$$K_2 = 2k \quad (15.11b)$$

$$K_1/K_2 = 1/4 \quad (15.11b)$$

Таким образом, даже в случае, когда микроскопические константы диссоциации для всех стадий ионизации одинаковы, статистические эффекты приводят к тому, что первая кажущаяся макроскопическая константа диссоциации *в четыре раза меньше*, чем вторая.

Понятие о микроскопических и макроскопических константах часто используется в этой главе и гл. 17, и необходимо четко представлять себе различие между ними, что наглядно показано на рассмотренных выше примерах.

15.3. Идентичные и независимые центры связывания

РАСЧЕТ ЧИСЛА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ФОРМ

Рассмотрим макромолекулу M, которая содержит *n* центров связывания лиганда L. Все центры характеризуются одной и той же микроскопической константой диссоциа-

ции k . Предполагается также, что центры независимы, т.е. для отдельного центра величина микроскопической константы диссоциации не зависит от занятости других центров. Равновесия, которые характеризуют взаимодействие макромолекулы с лигандом, можно записать следующим образом:



где индекс при M обозначает общее число связанных молекул L . Так, M_i представляет собой полный набор микроскопических форм, которые содержат i связанных молекул L . Например, для случая $n = 4$ изобразим схематически макромолекулу в виде квадрата с четырьмя центрами:



где каждая микроскопическая форма представлена в равных количествах. Таким образом, при $n = 4$ M_2 представлена шестью микроскопическими формами. В общем случае имеется $\Omega_{n,i}$ различных путей размещения i лигандов на n центрах¹, где

$$\Omega_{n,i} = \frac{n \times (n-1) \times (n-2) \times \dots \times (n-i+1)}{i!} = \frac{n!}{(n-i)!i!} \quad (15.14)$$

Следовательно, форма M_i включает в себя $\Omega_{n,i}$ микроскопических форм.

РАСЧЕТ ВЕЛИЧИНЫ ν

Определение равновесного связывания лиганда с макромолекулами, как правило, дает число молей лиганда, связанных с одним молем макромолекул. Этот параметр обычно обозначается ν и определяется следующим соотношением:

$$\nu = \sum_{i=0}^n i(M_i) / \sum_{i=0}^n (M_i) \quad (15.15)$$

Необходимо выразить ν через концентрацию свободного лиганда L .

¹ Уравнение (15.14) можно получить довольно легко. Допустим, что макромолекула имеет n разных центров, доступных для первой молекулы лиганда; после того как первая молекула связалась, остается $n-1$ центров, доступных для второй молекулы, затем $n-2$ центров, доступных для третьей молекулы, и т.д. до $n-i+1$ центров, доступных для i -й молекулы лиганда. Произведение $n(n-1) \dots (n-i+1)$ дает общее число возможных вариантов размещения лиганда на n центрах связывания. Число интересующих нас вариантов на самом деле меньше, поскольку мы учитывали более одного раза каждое отдельное размещение i молекул лиганда на n центрах. Например, размещение первой молекулы лиганда в центре 2, а второй — в центре 4 и, наоборот, первой молекулы в центре 4, а второй — в центре 2 приведет к одному и тому же конечному результату. В произведении $n(n-1) \dots (n-i+1)$ мы учитывали каждое отдельное размещение $i!$ раз, поэтому необходимо ввести на это поправку.

Заметим также, что $\Omega_{n,i}$ является биномиальным коэффициентом при x^i в разложении $(1+x)^n$.

Вообще, если использовать макроскопические константы диссоциации, то концентрацию формы M_i можно выразить через концентрацию любой другой формы. Например:

$$K_1 = (M_0)(L)/(M_1) \quad (15.16a)$$

$$\vdots$$

$$K_i = (M_{i-1})(L)/(M_i) \quad (15.16b)$$

$$\vdots$$

$$K_n = (M_{n-1})(L)/(M_n) \quad (15.16в)$$

и

$$(M_i) = (M_{i-1})(L)/K_i = (M_0)(L)^i / \prod_{j=1}^i K_j \quad (15.17)$$

Следует отличать макроскопическую константу K_i от единственной микроскопической константы k , которая характеризует все центры связывания. Константа диссоциации k относится к равновесию с участием отдельных микроскопических форм, тогда как макроскопическая константа включает весь набор форм, обозначенных M_i и M_{i-1} . Например, для случая $n = 4$, используя принятое в уравнении (15.13) изображение, можно записать

$$k = \frac{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline & \\ \hline \end{array} \right) (L)}{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline & L \\ \hline & \\ \hline \end{array} \right)} = \frac{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline & \\ \hline \end{array} \right) (L)}{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline & L \\ \hline L & L \\ \hline \end{array} \right)} = \frac{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline L & \\ \hline \end{array} \right) (L)}{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline L & L \\ \hline L & L \\ \hline \end{array} \right)} = \dots \quad (15.18)$$

тогда как

$$K_1 = \frac{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline & \\ \hline \end{array} \right) (L)}{\left(\begin{array}{|c|c|} \hline L & \\ \hline & \\ \hline \end{array} \right) + \left(\begin{array}{|c|c|} \hline & L \\ \hline & \\ \hline \end{array} \right) + \left(\begin{array}{|c|c|} \hline & \\ \hline & L \\ \hline \end{array} \right) + \left(\begin{array}{|c|c|} \hline L & \\ \hline L & \\ \hline \end{array} \right)} \quad (15.19)$$

Связь между K_i и k определяется статистическим множителем $\Omega_{n,i}$. В частности, легко показать (задача 15.1), что

$$K_i = (\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i})k \quad (15.20)$$

Поэтому уравнение (15.17) можно переписать в виде

$$(M_i) = (M_{i-1})(L)/K_i = (M_{i-1})[(n-i+1)/i][(L)/k] \quad (15.21)$$

Записав аналогичное выражение для (M_{i-1}) , (M_{i-2}) и т.д., получаем

$$(M_i) = (M_0) \left\{ \prod_{j=1}^i [(n-j+1)/j] \right\} [(L)/k]^i \quad (15.22)$$

Подстановка выражения (15.22) в (15.15) приводит к следующему соотношению:

$$v = \frac{\sum_{i=1}^n i \left\{ \prod_{j=1}^i [(n-j+1)/j] \right\} [(L)/k]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i [(n-j+1)/j] \right\} [(L)/k]^i} \quad (15.23)$$

Уравнение (15.23) оказалось алгебраически сложным, но его можно легко упростить. Произведение, входящее в это уравнение, идентично выражению для $\Omega_{n,i}$ [уравнение (15.14)]:

$$\prod_{j=1}^i [(n-j+1)/j] = n!/(n-i)!i! \quad (15.24)$$

Подставляя уравнение (15.24) в уравнение (15.23), получаем

$$v = \frac{\sum_{i=1}^n i [n!/(n-i)!i!] [(L)/k]^i}{1 + \sum_{i=1}^n [n!/(n-i)!i!] [(L)/k]^i} \quad (15.25)$$

Выражение в числителе уравнения (15.25) представляет собой биномиальное разложение $[1 + (L)/k]^n$:

$$[1 + (L)/k]^n = 1 + \sum_{i=1}^n [n!/(n-i)!i!] [(L)/k]^i \quad (15.26)$$

Дифференцирование уравнения (15.26) по $(L)/k$ и последующее умножение на $(L)/k$ приводит к следующему уравнению:

$$n[(L)/k][1 + (L)/k]^{n-1} = \sum_{i=1}^n i [n!/(n-i)!i!] [(L)/k]^i \quad (15.27)$$

Правая часть уравнения (15.27) представляет собой числитель выражения (15.25). Подставляя уравнения (15.26) и (15.27) в уравнение (15.25), получаем

$$v = \frac{n(L)/k}{1 + (L)/k} \quad (15.28)$$

или

$$v/(L) = n/k - v/k \quad (15.29)$$

Уравнения (15.28) и (15.29), простые по форме, можно вывести, и не прибегая к статистическим представлениям. Однако приведенный вывод полезен для понимания статистических особенностей равновесий при связывании лигандов с макромолекулами.

ПРОСТОЙ ВЫВОД

Уравнение (15.28) можно получить более легким способом. Этот способ основан на рассмотрении равновесия при связывании лиганда только в центре i . Пусть θ_i — степень насыщения центра i лигандом. Тогда

$$\begin{aligned} \theta_i &= (\text{Занятый центр } i) / [(\text{Свободный центр } i) + (\text{Занятый центр } i)] = \\ &= \frac{(\text{Свободный центр } i) [(\text{Занятый центр } i) / (\text{Свободный центр } i)]}{(\text{Свободный центр } i) [1 + (\text{Занятый центр } i) / (\text{Свободный центр } i)]} \end{aligned} \quad (15.30)$$

Так как $(\text{Занятый центр } i) / (\text{Свободный центр } i) = (L)/k$,

$$\theta_i = \frac{(L)/k}{1 + (L)/k} \quad (15.31)$$

Аналогичное выражение может быть записано для каждого из i идентичных центров связывания. Просуммировав эти n выражений, получим уравнение (15.28) (отметим, что

$$\sum_i \theta_i = \nu).$$

ГРАФИК СКЭТЧАРДА

В простом случае идентичных и независимых центров уравнение (15.29), в которое входят величины ν и (L) , является особенно удобным для анализа экспериментальных данных. График зависимости $\nu/(L)$ от ν называют иногда графиком Скэтчарда (см. Scatchard, 1949). Эта зависимость является линейной; наклон соответствующей прямой равен $-k^{-1}$, и она отсекает на оси ординат отрезок, равный по величине n/k , а на оси абсцисс отрезок, равный n , как показано на рис. 15.1. Таким образом, построение подобного графика дает простой и удобный способ определения двух параметров, характеризующих равновесное связывание лигандов с макромолекулами.

15.4. Несколько типов независимых центров связывания

НЕЛИНЕЙНЫЕ ГРАФИКИ СКЭТЧАРДА

График Скэтчарда $\nu/(L)$ от ν во многих случаях оказывается нелинейным. Это может означать, что макромолекула имеет центры связывания более чем одного типа. Предположим, что существует n_1 независимых центров связывания, характеризующихся микроскопической константой диссоциации k_1 , n_2 центров, характеризующихся константой диссоциации k_2 и т.д. В таком случае для каждого типа центров связывания справедливо

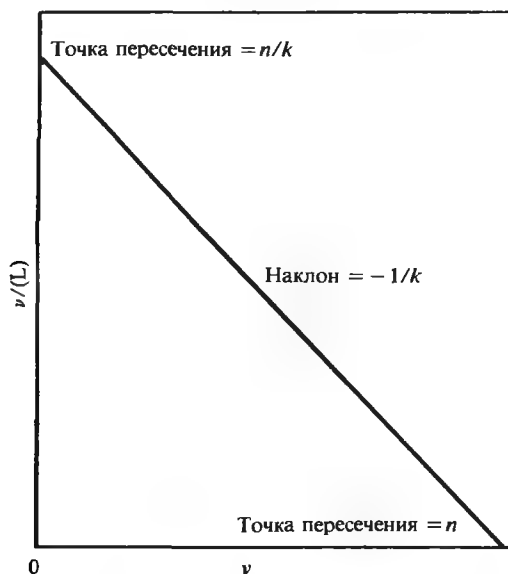


РИС. 15.1. График Скэтчарда для случая идентичных и независимых центров связывания.

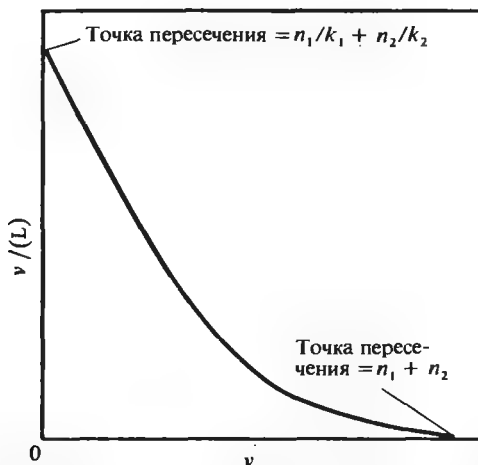


РИС. 15.2. График Скэтчарда, состоящий из двух участков.

уравнение, аналогичное уравнению (15.28). Таким образом, получаем следующие выражения:

$$\nu = \sum_i \frac{n_i(L)/k_i}{1 + (L)/k_i} \quad (15.32)$$

и

$$\nu/(L) = \sum_i \frac{n_i/k_i}{1 + (L)/k_i} \quad (15.33)$$

Уравнения (15.32) и (15.33) являются параметрическими и могут быть использованы для определения параметров n_i и k_i из графика Скэтчарда. На рис. 15.2 представлен график Скэтчарда, состоящий из двух участков, который иллюстрирует случай связывания лиганда с макромолекулой, имеющей независимые центры двух типов.

АНАЛИЗ ГРАФИКА СКЭТЧАРДА, СОСТОЯЩЕГО ИЗ ДВУХ УЧАСТКОВ

Кривая, представленная на рис. 15.2, может быть разложена на составляющие следующим образом. На графике проводится касательная к кривой при значениях ν , близких к нулю. Точка пересечения этой касательной с осью $\nu/(L)$ ¹⁾ дает значение $(n_1/k_1 + n_2/k_2)$. Для

¹⁾ Отношение $\nu/(L)$ стремится к 0/0, когда $(L) \rightarrow 0$. Эту неопределенность можно раскрыть с помощью правила Лопиталю, согласно которому предел отношения равен пределу производной числителя (ν), деленной на производную знаменателя (L) . Из уравнения (15.32) $[d\nu/d(L)]_{(L) \rightarrow 0} = \sum_i n_i/k_i$ и $d(L)/d(L) = 1$; следовательно,

$$\lim_{(L) \rightarrow 0} [\nu/(L)] = \sum_i n_i/k_i$$

Этот же результат получается при допущении, что в выражении правой части уравнения (15.33) $(L) \rightarrow 0$.

первой оценки параметров можно предположить, что сумма $n_1/k_1 + n_2/k_2$ определяется наименьшей константой диссоциации (обозначенной k_1). Тогда точка пересечения касательной с осью ординат дает возможность оценить n_1/k_1 , а величину отрезка, отсекаемого на оси ν , можно принять за первую оценку n_1 . Используя полученные значения n_1 и k_1 , можно учесть вклад в экспериментальные данные центров с более сильным связыванием (характеризующихся более низкой k). Затем, для того чтобы оценить значения n_2 и k_2 , строят новый график и анализируют его согласно уравнению (15.29).

Далее для уточнения приблизительных значений всех параметров используют следующий прием обработки данных. Например, вычитая из величины отрезка, отсекаемого касательной на оси $\nu/(L)$, найденное приблизительное значение n_2/k_2 , можно вновь оценить n_1/k_1 . После этого обработка может быть продолжена до получения новых значений n_2 и k_2 . Процедура расчета считается удовлетворительной, если для найденных параметров сумма $n_1 + n_2$ равна отрезку, отсекаемому кривой зависимости $\nu/(L)$ от (ν) на оси абсцисс, а $\sum_i (n_i/k_i)$ равна отрезку, отсекаемому этой кривой на оси ординат.

На рис. 15.3 представлены экспериментальные данные по изучению связывания в 0,1 М триэтаноламине ионов Mn^{2+} с 5'-концевым фрагментом индивидуальной тРНК (3/5 молекулы). Если исходить из структуры клеверного листа, то можно считать, что этот фрагмент нуклеиновой кислоты содержит однопочечные области, двухпочечный участок шпильки и петлю шпильки. Анализ данных с помощью описанного выше метода для случая двух типов центров связывания приводит к следующим значениям параметров: $n_1 = 6$, $n_2 = 10$ и $k_1 = 14$ мкМ, $k_2 = 200$ мкМ. На рис. 15.3 точки являются экспериментальными, а кривая построена с использованием этих рассчитанных параметров. Видно, что расчетные и экспериментальные данные достаточно хорошо согласуются.

Возникает вопрос: являются ли однозначными параметры, полученные на основании анализа графика Скэтчарда, состоящего из нескольких участков? Например, можно ли с использованием других значений n_i и k_i так же хорошо описать экспериментальные дан-

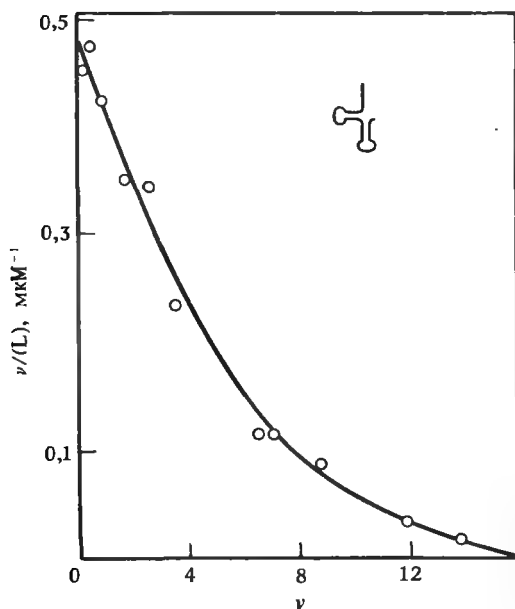


РИС. 15.3. График Скэтчарда, состоящий из двух участков, для случая связывания Mn^{2+} с 5'-концевым фрагментом индивидуальной тРНК (3/5 молекулы).

ные, представленные на рис. 15.3? В рассмотренном примере при ограничении $n_1 + n_2 = \text{const}$ изменения в величине n_i на ± 1 приводят к относительно небольшим (менее чем на 50%) изменениям значений k_i . Это дает основание полагать, что рассчитанные значения k_i являются достоверными. Остается вопрос: можно ли так же хорошо описать экспериментальные данные, предполагая у макромолекулы наличие центров связывания более двух типов? Конечно, большее число параметров позволяет подогнать к модели любые данные и получить более хорошее соответствие между расчетом и экспериментом. Однако для объяснения результатов (в пределах экспериментальных ошибок) лучше всего использовать наименьшее число возможных допущений и параметров. Такой подход дает возможность описать систему минимальным (и, по-видимому, основным) числом параметров.

15.5. Взаимодействие между центрами связывания

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Возникает вопрос: только ли с помощью предположения о наличии центров связывания разных типов и уравнений (15.32) и (15.33) можно объяснить нелинейность графиков Скэтчарда? Ясно, что не только. Вполне вероятно, например, что связывание одной молекулы лиганда изменяет средство макромолекулы к следующей молекуле лиганда и, таким образом, действительно вызывает непрерывное изменение микроскопической константы диссоциации.

Рассмотрим простой случай идентичных центров одного типа и обозначим через k_0 микроскопическую константу диссоциации при $\nu = 0$. По мере увеличения ν из-за взаимодействия между центрами величина k будет изменяться. Пусть ΔG^0 — изменение стандартной свободной энергии при диссоциации связанного лиганда. Эта величина равна

$$\Delta G^0 = \Delta G_0^0 + RT\phi(\nu) \quad (15.34)$$

где $\Delta G_0^0 = -RT \ln k_0$, $\phi(\nu)$ — функция, учитывающая по определению влияние взаимодействия между центрами, которое зависит от степени насыщения. Из уравнения (15.34) и соотношения $k(\nu) = e^{-\Delta G^0/RT}$ получаем

$$k(\nu) = k_0 e^{-\phi(\nu)} \quad (15.35)$$

где $\phi(\nu) = 0$ при $\nu = 0$.

Итак, уравнения (15.28) и (15.29) можно использовать, заменив k на $k(\nu)$, определяемое соотношением (15.35). Если $\phi(\nu)$ уменьшается при увеличении ν , то $k(\nu)$ увеличивается по мере насыщения. В этом случае, согласно уравнению (15.29), график Скэтчарда будет не линейным, а вогнутым. Вместе с тем, если $\phi(\nu)$ увеличивается при возрастании ν , то на графике Скэтчарда будет наблюдаться «горб», т.е. соответствующая кривая будет выпуклой, так как последующие молекулы лиганда будут связываться все более прочно (уменьшение констант диссоциации). Эта ситуация соответствует случаю, когда при увеличении ν имеет место кооперативное взаимодействие между центрами. Два рассмотренных случая иллюстрирует рис. 15.4.

Поскольку $\phi(\nu)$ является совершенно произвольной функцией, ее всегда можно задать так, что с помощью уравнений (15.28) и (15.35) можно описать любые эффекты. В идеальном случае нужно иметь об исследуемой системе такие данные, которые позволили бы с достаточным основанием сделать выбор, каким образом лучше объяснить нелинейность графика Скэтчарда: используя уравнение (5.35) или опираясь на предположение о наличии независимых типов центров. Если мы решим, что для описания лучше использовать урав-

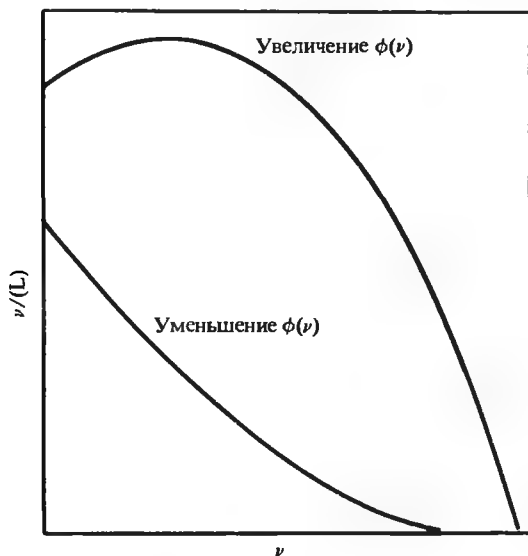


РИС. 15.4. Гипотетические графики Скэтчарда для случаев, когда $\phi(\nu)$ уменьшается или увеличивается по мере роста ν .

нение (15.35), то нам нужно будет построить модель системы, позволяющую теоретически получить выражение для $\phi(\nu)$. Например, для определения $\phi(\nu)$ в случае связывания ионов с заряженной макромолекулой можно использовать простую теорию электростатических взаимодействий (см. Tanford, 1961). Получив $\phi(\nu)$, можно проверить, согласуются ли экспериментальные данные с уравнением (15.35) при данной $\phi(\nu)$.

Однако зачастую получить выражение для $\phi(\nu)$ не удастся, так как просто нет достаточного количества сведений о системе.

При отсутствии точных доказательств (или очевидности) отрицательного взаимодействия центров, которое описывается уравнением (15.35), для объяснения графика Скэтчарда, представляющего собой выпуклую кривую, лучше опираться на предположение о наличии центров независимых типов [уравнения (15.32) и (15.33)]. Это, по крайней мере, дает полезное феноменологическое описание системы. Кроме того, в некоторых случаях наличие центров истинно разных типов самоочевидно. Например, на рис. 15.3 приведены данные исследования макромолекулы, которая содержит как одноцепочечные, так и двухцепочечные участки. Так как известно, что участки этих двух типов существенно различаются по сродству к лиганду (Mn^{2+}), физически обоснованной является модель, включающая центры по крайней мере двух типов. Если, как и в этом случае, данные можно количественно объяснить наличием центров разных типов (существование которых не вызывает сомнений), то нет причин привлекать для объяснения возможное взаимодействие центров, описываемое $\phi(\nu)$.

Однако в случае представленного на рис. 15.4 выпуклого графика Скэтчарда нельзя предположить наличие независимых центров отдельных типов, так как уравнения (15.32) и (15.33) описывают только вогнутые кривые. Следовательно, выпуклые кривые являются окончательным доказательством того, что существует взаимодействие между центрами связывания: $\phi(\nu)$ уменьшается по мере увеличения ν . Такие системы рассматриваются в следующих разделах.

В общем случае, когда макромолекула имеет взаимодействующие центры связывания нескольких типов, применимы уравнения (15.32) и (15.33), в которых [по аналогии с урав-

нением (15.35)] k_i заменено на $k_i(\nu)$

$$k_i(\nu) = k_{0i} e^{-\phi_i(\nu)} \quad (15.36)$$

где k_{0i} — микроскопическая константа диссоциации при $\nu = 0$ для центров типа i , а $\phi_i(\nu)$ — функция, учитывающая взаимодействие центров типа i . Для каждого типа центров может быть своя собственная функция взаимодействия, поэтому $\phi_i(\nu)$ может отличаться от $\phi_j(\nu)$. Конечно, уравнения (15.32) и (15.33) вместе с уравнением (15.36) можно использовать только при условии, что функция $\phi_i(\nu)$ известна для каждого из различных типов центров.

Приведенное выше обсуждение служит цели наметить основные вопросы, которые должны рассматриваться при анализе взаимодействующих центров связывания. На практике наиболее часто встречающимися примерами взаимодействия центров являются, вероятно, кооперативные взаимодействия. Они будут рассмотрены ниже.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ КООПЕРАТИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

В биологии существует много примеров, когда взаимодействия лигандов с макромолекулами представляют собой кооперативные процессы. Одним из наиболее хорошо изученных примеров является связывание кислорода гемоглобином, которое подробно обсуждается в гл. 17. Кроме того, кооперативно связывают субстраты и другие молекулы многие мультисубъединичные ферменты. Например, подобным образом функционирует фермент аспартат-карбамоилтрансфераза (рассмотренный в гл. 17). И наконец, нуклеиновые кислоты в некоторых случаях также связывают отдельные лиганды кооперативно. Таким образом, *кооперативные взаимодействия широко распространены в биологических системах.*

Кооперативное связывание лигандов с макромолекулами рассматривалось многими авторами. Некоторые аспекты анализа, проведенного ими, и отдельные модели кооперативности обсуждаются в гл. 17. В этом разделе, однако, имеет смысл рассмотреть основные характеристики взаимодействий такого типа.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ И ЭНЕРГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Рассмотрим в качестве примера макромолекулу, которая присоединяет четыре молекулы лиганда L. Если все центры являются идентичными и независимыми и связывание L характеризуется микроскопической константой диссоциации k , то, согласно уравнению (15.20), четыре макроскопические константы диссоциации равны

$$K_1 = (1/4)k \quad (15.37a)$$

$$K_2 = (2/3)k \quad (15.37b)$$

$$K_3 = (3/2)k \quad (15.37в)$$

$$K_4 = 4k \quad (15.37г)$$

Поэтому в данном случае $K_1 < K_2 < K_3 < K_4$; т.е. с точки зрения макроскопических констант связывание, по-видимому, постепенно ослабевает по мере насыщения макромолекулы лигандом, несмотря на то что все центры характеризуются одной и той же величиной микроскопической константы. Таким образом, с точки зрения макроскопических констант диссоциации статистические эффекты приводят к тому, что при связывании наблюдается кажущаяся *антикооперативность*.

В кооперативных системах, в которых учтены статистические эффекты, кажущаяся константа диссоциации для одной или более последовательных стадий уменьшается по мере насыщения макромолекулы лигандом. В случае макромолекулы с четырьмя центрами связывания это означает, что если кооперативность имеет место между первой и второй стадией, то тогда [как следствие уравнений (15.37)] $4K_1 > (3/2)K_2$; если на всех четырех стадиях происходит постепенное усиление связывания, то $4K_1 > (3/2)K_2 > (2/3)K_3 > > (1/4)K_4$.

Кооперативность при связывании двух молекул лиганда может быть выражена в энергетических единицах следующим простым способом. Пусть $\Delta G_i^0 = RT \ln K_i$ — изменение кажущейся стандартной свободной энергии при связывании i -й молекулы лиганда. (Напомним, что K_i — константа диссоциации, поэтому $-RT \ln K_i$ представляет собой изменение свободной энергии при диссоциации; следовательно, $+RT \ln K_i$ является изменением свободной энергии при связывании.) Это выражение для изменения свободной энергии содержит чисто статистический множитель $RT \ln (\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i})$ [см. уравнение (15.20)]. Для того чтобы вычленить этот статистический множитель, обозначим $\Delta \bar{G}_i^0$ изменение микроскопической стандартной свободной энергии при связывании i -й молекулы лиганда. Эта величина равна

$$\Delta \bar{G}_i^0 = +RT \ln K_i - RT \ln (\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i}) \quad (15.38)$$

Определим энергию взаимодействия $\Delta G_{1,j}$ в расчете на центр как разность между величинами свободной энергии связывания i -й и j -й молекул лиганда. Эта величина энергии взаимодействия составляет

$$\begin{aligned} \Delta G_{1,j} &= \Delta \bar{G}_j^0 - \Delta \bar{G}_i^0 \\ &= -RT \ln (K_i/K_j) + RT \ln \left(\frac{\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i}}{\Omega_{n,j-1}/\Omega_{n,j}} \right) \end{aligned} \quad (15.39)$$

При данном определении $\Delta G_{1,j}$, если j -я молекула лиганда связывается более сильно по сравнению с i -й молекулой ($j > i$), то для такой кооперативной системы $\Delta G_{1,j} < 0$. Следует отметить, что если каждый центр связывания характеризуется одной и той же микроскопической константой диссоциации, то два члена в правой части уравнения (15.39) сокращаются и $\Delta G_{1,j} = 0$.

В случае связывания кислорода гемоглобином человека уравнение (15.39) приводит к значению $\Delta G_{1,j} \cong -2 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{центр}^{-1}$ для $i = 1$ и $j = 4$. Это означает, что взаимодействие между центрами приводит к тому, что энергия связывания четвертой молекулы кислорода на 2 ккал/моль выше энергии связывания молекулы кислорода с гемоглобином, имеющим три свободных центра.

ПОЛУЭМПИРИЧЕСКИЙ ПОДХОД: КОЭФФИЦИЕНТ ХИЛЛА

При анализе процессов кооперативного связывания лигандов с макромолекулой обычно используют полуэмпирический подход для определения параметров связывания, а затем объясняют их физический смысл. Полуэмпирический метод основан на предположении, что связывание в пределах части области насыщения описывается уравнениями, феноменологически похожими на уравнения для случая систем с высокой степенью кооперативности. В крайнем случае — бесконечно высокой степени кооперативности — связывание может быть представлено как реакция, протекающая по принципу «все или ничего»:



$$K^n = (M_0)(L)^n / (M_n) \quad (15.41)$$

где K — кажущаяся константа диссоциации для взаимодействующих центров. В этом случае параметр ν равен

$$\begin{aligned} \nu &= n(M_n) / [(M_0) + (M_n)] \\ &= [n(L)^n / K^n] / [1 + (L)^n / K^n] \end{aligned} \quad (15.42a)$$

$$\nu / (L) = [n(L)^{n-1} / K^n] / [1 + (L)^n / K^n] \quad (15.42b)$$

а степень насыщения $\bar{y} = \nu / n$ равна

$$\bar{y} = [(L)^n / K^n] / [1 + (L)^n / K^n] \quad (15.43)$$

Уравнения (15.40) — (15.43) основаны на предположении, что связывание всех n лигандов протекает с бесконечно высокой степенью кооперативности. В действительности такая кооперативность не обнаружена. Экспериментальные данные о кооперативных взаимодействиях описываются полуэмпирическими соотношениями типа уравнений (15.40) — (15.43) только в некотором интервале степени насыщения, обычно от 25 до 75%. Это следующие полуэмпирические уравнения:

$$\nu = [n(L)^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}] / [1 + (L)^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}] \quad (15.44a)$$

$$\nu / (L) = [n(L)^{\alpha_H-1} / K^{\alpha_H}] / [1 + (L)^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}] \quad (15.44b)$$

$$\bar{y} = [(L)^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}] / [1 + (L)^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}] \quad (15.45)$$

где $1 \leq \alpha_H \leq n$. Параметр α_H называют обычно коэффициентом Хилла (см. Hill, 1910); он является характеристикой кооперативности. Когда $\alpha_H = n$, система ведет себя как идеально кооперативная, если $\alpha_H = 1$, то кооперативность отсутствует. На рис. 15.5 пред-

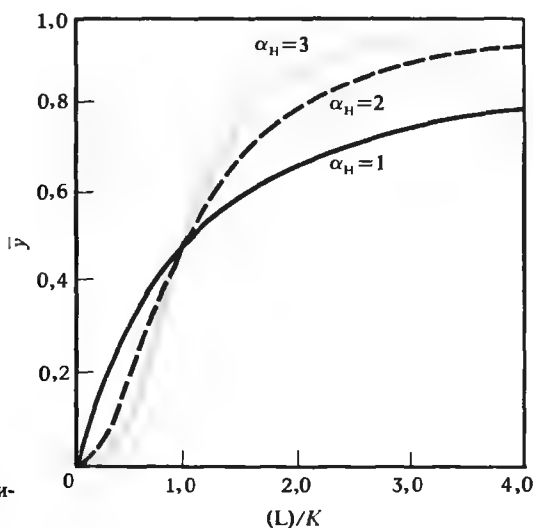


РИС. 15.5. Влияние параметра α_H на форму кривых насыщения.

ставлены графики зависимости $\bar{y}$ от $(L)/K$ для разных значений α_H . На рисунке ясно видно, что крутизна кривой очень чувствительна к изменению α_H .

Как следует из уравнения (15.45), параметр α_H равен

$$\frac{d\{\ln[\bar{y}/(1 - \bar{y})]\}}{d[\ln(L)]} = \alpha_H \quad (15.46)$$

Уравнение (15.46) является удобным определением коэффициента Хилла. Обычно это соотношение выполняется не во всей области значений $\bar{y}$, т.е. α_H является функцией степени насыщения. Параметр α_H часто оценивают при $\bar{y} = 1 - \bar{y} = 1/2$. В этом случае уравнение (15.46) принимает следующий вид (заметим, что $d \ln x = dx/x$):

$$\left(\frac{d(\bar{y}/(1 - \bar{y}))}{d(L)} \right)_{\bar{y}=1/2} = \frac{\alpha_{H,1/2}}{(L)_{1/2}} \quad (15.47)$$

где $(L)_{1/2}$ — концентрация L в области полунасыщения ($\bar{y} = 1/2$) и $\alpha_{H,1/2} = \alpha_H$ при $\bar{y} = 1/2$. Уравнения (15.46) и (15.47) показывают, что коэффициент Хилла может быть получен из наклона графика зависимости $\ln [\bar{y}/(1 - \bar{y})]$ от $\ln (L)$, который называют обычно графиком Хилла.

Уравнения (15.44а) и (15.44б) показывают связь между параметрами; они могут быть использованы при анализе кооперативного связывания с помощью графиков Скэтчарда, иногда в широком диапазоне значений ν и (L) . Эти графики заметно отличаются от ранее обсуждавшихся графиков для связывания лиганда в независимых и не взаимодействующих центрах. Согласно уравнению (15.44б), при $\alpha_H > 1$ кривая действительно проходит через начало координат, потому что, когда $\nu = 0$ [или $(L) = 0$], $\nu/(L)$ тоже равна 0. В области низких значений ν или (L) величина $\nu/(L)$ растет по мере увеличения ν и достигает предельного значения при $\nu_{\max} = n(\alpha_H - 1)/\alpha_H$, а затем уменьшается, и кривая пересекает ось ν в точке $\nu = n$.

На рис. 15.6 приведен пример графика Скэтчарда такого типа. На этом рисунке представлены данные о кооперативном связывании Mn^{2+} с тРНК. Выпуклый характер кривой очевиден. Параметры, характеризующие взаимодействие, можно получить, выразив K^{α_H} через

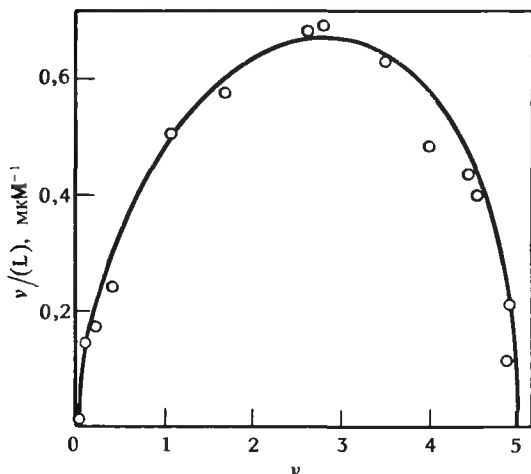


РИС. 15.6. График Скэтчарда для связывания Mn^{2+} с индивидуальной тРНК. (Schreier, Schimmel, J. Mol. Biol., **86**, 601, 1974.)

экспериментально определяемые переменные следующим образом:

$$K^{\alpha_H} = (L)^{\alpha_H} [n(M)_0 - (L)_{\text{св}}] / (L)_{\text{св}} \quad (15.48)$$

Преобразуя это уравнение, получаем

$$\ln(L) = -(1/\alpha_H) \ln[(n/\nu) - 1] + \ln K \quad (15.49)$$

где $(L)_{\text{св}}$ — концентрация связанного лиганда, $(M)_0$ — общая концентрация макромолекул и $\nu = (L)_{\text{св}} / (M)_0$. Из уравнения (15.49) ясно, что зависимость $\ln(L)$ от $\ln[(n/\nu) - 1]$ должна быть линейной. Наклон прямой равен $-1/\alpha_H$, и точка пересечения ее с осью абсцисс дает $-\ln K$. Прямолинейность этого графика очень чувствительна к значению n , использованному при его построении. Таким образом, существует хороший способ проверки величины n , определенной из графика Скэтчарда. Если представить данные, приведенные на рис. 15.6, согласно уравнению (15.49), то они очень хорошо описываются этим уравнением при следующих значениях параметров: $n = 5$, $\alpha_H = 2,3$ и $K = 3,7$ мкМ. Полученные результаты говорят о том, что связывание Mn^{2+} является кооперативным и в нем принимает участие около 5 центров макромолекулы; однако связывание не протекает полностью по принципу «все или ничего», так как $\alpha_H < n$. В данном случае наблюдается аналогия со связыванием кислорода с гемоглобином, для которого $\alpha_H = 2,5$, а $n = 4$.

Здесь мы не будем больше обсуждать эти данные, хотя подобные результаты оказались очень полезными для построения модели связывания катионов с тРНК (см. Schimmel, 1976).

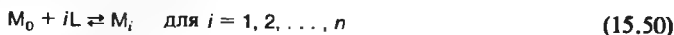
● 15.6. Связывание двух различных лигандов: уравнения, описывающие взаимное влияние лигандов на их связывание

До сих пор мы обсуждали только те случаи, когда с макромолекулой связываются лиганды одного сорта. Однако на практике встречаются ситуации, когда необходимо рассматривать одновременное связывание с макромолекулой двух различных лигандов. Одним из примеров такой ситуации является влияние рН на связывание лиганда. В этом случае протонирование одного или нескольких критических центров макромолекулы тесно связано с присоединением к ней лиганда.

Имеется целый ряд интересных и полезных соотношений, описывающих взаимозависимые равновесия для процесса связывания с макромолекулой двух разных лигандов. При их анализе мы будем придерживаться пути, разработанного Уайменом (Wyman, 1964). Начнем опять с рассмотрения связывания молекул одного лиганда L в n центрах макромолекулы M . Здесь мы будем использовать математический аппарат, несколько отличающийся от изложенного ранее; он удобен, в частности, для анализа взаимозависимых равновесий.

● ФОРМАЛЬНАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ТРАКТОВКА

Макроскопические равновесия можно записать следующим образом:



Кажущаяся константа диссоциации равна

$$\tilde{K}_i = (M_0)(L)^i / (M_i) \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n \quad (15.51)$$

где (M_i) — концентрация макромолекул, содержащих i связанных молекул лиганда. Заметим, что это определение K_i отличается от использованного ранее определения макроскопической константы K_i [уравнение (15.16)]. Число молей связанного лиганда в расчете на моль M равно $n\bar{y}$. Этот параметр равен

$$n\bar{y} = \frac{\sum_{i=0}^n i(M_i)}{\sum_{i=0}^n (M_i)} = \frac{\sum_{i=0}^n [i(L)^i / \tilde{K}_i]}{\sum_{i=0}^n [(L)^i / \tilde{K}_i]} \quad (15.52)$$

$$n\bar{y} = \frac{d\left(\ln \sum_{i=0}^n [(L)^i / \tilde{K}_i]\right)}{d[\ln(L)]} \quad (15.53)$$

где $\tilde{K}_0$ равна единице. Наиболее часто применяется уравнение (15.53).

Каждая $\tilde{K}_i$ связана с микроскопическими константами, которые характеризуют присоединение лиганда к каждому из n центров макромолекулы M . Предположив, что микроскопические константы различаются, и обозначив их через $k_1, k_2, \dots, k_n$, можно легко показать (задача 15.5), что

$$\sum_{i=0}^n [(L)^i / \tilde{K}_i] = [1 + (L)/k_1][1 + (L)/k_2] \cdots [1 + (L)/k_n] \quad (15.54)$$

Если каждая $k_i = k$, то

$$\sum_{i=0}^n [(L)^i / \tilde{K}_i] = [1 + (L)/k]^n \quad (15.55)$$

и из уравнения (15.53) получаем, что

$$\bar{y} = [(L)/k] / [1 + (L)/k] \quad (15.56)$$

Уравнение (15.56) идентично уравнению (15.28) при $\bar{y} = \nu/n$.

● ДВА ЛИГАНДА И ОСНОВНОЕ СООТНОШЕНИЕ, ОПИСЫВАЮЩЕЕ ИХ ВЗАИМОЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

Предположим, что имеется два лиганда, L_1 и L_2 . Макромолекула содержит n центров связывания L_1 и m центров связывания L_2 . Обозначим через y_1 степень насыщения макромолекулы лигандом L_1 , а через y_2 — лигандом L_2 . Для равновесия



определим макроскопическую константу диссоциации $\tilde{K}_{ij}$ следующим образом:

$$\tilde{K}_{ij} = (L_1)^i (L_2)^j (M_0) / (M_{ij}) \quad (15.58)$$

где M_{ij} — макромолекула, содержащая i связанных молекул L_1 и j связанных молекул L_2 , а M_0 — макромолекула, которая не содержит связанных лигандов. Заметим, что $K_{00} = 1$.

Тогда параметр $n\bar{y}_1$ равен

$$n\bar{y}_1 = \frac{\sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m i(M_{ij})}{\sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m (M_{ij})} \quad (15.59)$$

Используя уравнение (15.58), получаем

$$n\bar{y}_1 = \frac{\sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m [i(L_1)^i(L_2)^j/\tilde{K}_{ij}]}{\sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m [(L_1)^i(L_2)^j/\tilde{K}_{ij}]} \quad (15.60)$$

или

$$n\bar{y}_1 = \left(\frac{\partial \left\{ \ln \sum_i \sum_j [(L_1)^i(L_2)^j/\tilde{K}_{ij}] \right\}}{\partial [\ln(L_1)]} \right)_{(L_2)} \quad (15.61)$$

Аналогичным образом параметр $m\bar{y}_2$ равен

$$m\bar{y}_2 = \left(\frac{\partial \left\{ \ln \sum_i \sum_j [(L_1)^i(L_2)^j/\tilde{K}_{ij}] \right\}}{\partial [\ln(L_2)]} \right)_{(L_1)} \quad (15.62)$$

Для заданных значений $\tilde{K}_{ij}$ двойная сумма в уравнениях (15.61) и (15.62) является функцией только концентрации L_1 и L_2 , поэтому,

$$d(\ln \sum \sum) = \left(\frac{\partial \sum \sum}{\partial [\ln(L_1)]} \right)_{(L_2)} d[\ln(L_1)] + \left(\frac{\partial \sum \sum}{\partial [\ln(L_2)]} \right)_{(L_1)} d[\ln(L_2)] \quad (15.63)$$

$$d(\ln \sum \sum) = n\bar{y}_1 d[\ln(L_1)] + m\bar{y}_2 d[\ln(L_2)] \quad (15.64)$$

где знаки $\sum \sum$ обозначают двойную сумму в числителе уравнения (15.61) или (15.62). Используя соотношение для смешанных частных производных (см. Дополнение 15.1), из уравнения (15.64) получаем

$$n \left(\frac{\partial \bar{y}_1}{\partial [\ln(L_2)]} \right)_{(L_1)} = m \left(\frac{\partial \bar{y}_2}{\partial [\ln(L_1)]} \right)_{(L_2)} \quad (15.65)$$

Уравнение (15.65) является основным соотношением, описывающим взаимное влияние лигандов на их связывание. Оно показывает, что при постоянной концентрации L_1 увеличение концентрации L_2 приводит к изменению числа молей лиганда L_1 , связанного с макромолекулой, в точности равному изменению числа молей L_2 , связанного с макромолекулой, вызванному увеличением концентрации L_1 при постоянной концентрации L_2 .

● ДРУГОЕ УРАВНЕНИЕ, ОПИСЫВАЮЩЕЕ ВЗАИМОЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ

Из четырех переменных $\bar{y}_1$, $\bar{y}_2$, (L_1) и (L_2) только две являются независимыми. Поэтому уравнение (15.65) можно записать в другой форме. Наиболее часто используемая форма

этого уравнения включает производную $(\partial y_1 / \partial y_2)_{(L_1)}$, которую можно найти с использованием правила «цепи» (Дополнение 15.2):

$$(\partial \bar{y}_1 / \partial \bar{y}_2)_{(L_1)} = (\partial \bar{y}_1 / \partial [\ln(L_2)])_{(L_1)} (\partial [\ln(L_2)] / \partial \bar{y}_2)_{(L_1)} \quad (15.66)$$

Дополнение 15.1

ПЕРЕКРЕСТНОЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ

Для функции $f(x, y)$ двух независимых переменных x и y

$$\begin{aligned} df &= (\partial f / \partial x)_y dx + (\partial f / \partial y)_x dy \\ &= f_x dx + f_y dy \end{aligned}$$

где $f_x = (\partial f / \partial x)_y$ и $f_y = (\partial f / \partial y)_x$. Смешанные частные производные связаны соотношением

$$(\partial f_x / \partial y)_x = (\partial f_y / \partial x)_y$$

Это следует из уравнений для вторых производных

$$(\partial f_x / \partial y)_x = \frac{\partial}{\partial y} (\partial f / \partial x)_y = \frac{\partial^2}{\partial y \partial x} f = \frac{\partial^2}{\partial x \partial y} f = \frac{\partial}{\partial x} (\partial f / \partial y)_x = (\partial f_y / \partial x)_y$$

Подставляя уравнение (15.65) в уравнение (15.66), получаем

$$(\partial \bar{y}_1 / \partial \bar{y}_2)_{(L_1)} = (m/n) (\partial \bar{y}_2 / \partial [\ln(L_1)])_{(L_2)} (\partial [\ln(L_2)] / \partial \bar{y}_2)_{(L_1)} \quad (15.67)$$

Производную по $\bar{y}_2$ выражения в правой части уравнения (15.67) можно найти из полного дифференциала dy_2 :

$$d\bar{y}_2 = (\partial \bar{y}_2 / \partial [\ln(L_1)])_{(L_2)} d[\ln(L_1)] + (\partial \bar{y}_2 / \partial [\ln(L_2)])_{(L_1)} d[\ln(L_2)] \quad (15.68)$$

Если $\bar{y}_2$ — постоянная, то $d\bar{y}_2 = 0$ и уравнение (15.68) приобретает следующий вид:

$$(\partial [\ln(L_2)] / \partial \bar{y}_2)_{(L_1)} = -(\partial [\ln(L_1)] / \partial \bar{y}_2)_{(L_2)} (\partial [\ln(L_2)] / \partial [\ln(L_1)])_{\bar{y}_2} \quad (15.69)$$

Подставляя уравнение (15.69) в уравнение (15.67), получаем

$$\left(\frac{\partial [\ln(L_2)]}{\partial [\ln(L_1)]} \right)_{\bar{y}_2} = -\frac{n}{m} \left(\frac{\partial \bar{y}_1}{\partial \bar{y}_2} \right)_{(L_1)} \quad (15.70)$$

Величина $n d\bar{y}_1$ представляет собой изменение числа центров макромолекулы, занятых L_1 , а $-n d\bar{y}_1 = d[n(1 - \bar{y}_1)]$ — изменение числа свободных центров связывания L_1 . Поэтому левая часть уравнения (15.70) отражает изменение числа свободных центров связывания L_1 (или числа молей высвободившегося L_1) при связывании моля лиганда L_2 . Ясно, что число молей высвободившегося лиганда может быть положительным или отрицательным (отрицательное число соответствует связыванию лиганда).

Величина производной в левой части уравнения (15.70) может быть определена экспериментально. На рис. 15.7 представлены графики зависимости $\bar{y}_2$ от $\ln(L_2)$ при различных

Дополнение 15.2

ПРАВИЛО «ЦЕПИ»

Рассмотрим систему четырех переменных (f , g , x и y), из которых только две могут быть независимыми. Выберем в качестве независимых переменных x и y . Тогда

$$df = (\partial f / \partial x)_y dx + (\partial f / \partial y)_x dy \quad (A)$$

$$dg = (\partial g / \partial x)_y dx + (\partial g / \partial y)_x dy \quad (B)$$

Так как x и y являются независимыми, они могут изменяться произвольно. Пусть y будет постоянной, тогда $dy = 0$; разделив уравнение (A) на (B), получаем

$$(\partial f / \partial g)_y = (\partial f / \partial x)_y / (\partial g / \partial x)_y \quad (B)$$

$$(\partial f / \partial g)_y = (\partial f / \partial x)_y (\partial x / \partial g)_y \quad (Г)$$

Уравнение (Г) представляет собой правило «цепи», названное так потому, что две производные в его правой части образуют «цепь».

значениях $\ln(L_1)$. Например, лиганд L_1 может представлять собой H^+ , и тогда эти кривые просто иллюстрируют хорошо известные данные о влиянии pH на связывание лиганда (в данном случае лиганда L_2). Ясно, что величина $\Delta[\ln(L_2)]$ — разность по горизонтали между двумя соседними кривыми, деленная на $\Delta[\ln(L_1)]$, дает искомую производную. Аналогичный график для одновременного связывания с гемоглобином кислорода и дифосфоглицерата приводится в гл. 17 (рис. 17.21).

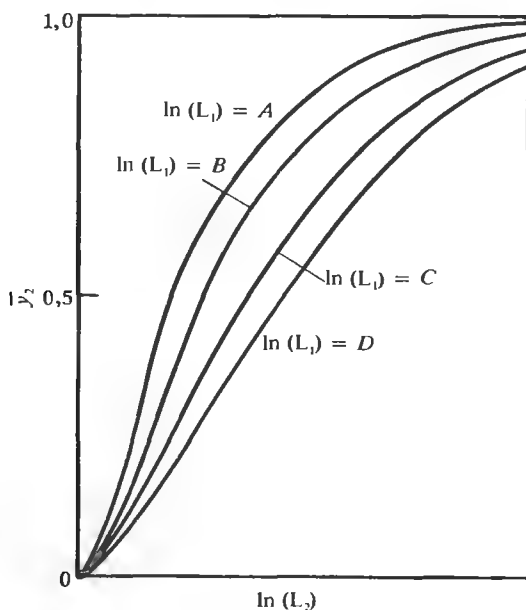


РИС. 15.7. Гипотетические графики зависимости y_2 от $\ln(L_2)$ при различных значениях $\ln(L_1)$.

В этом случае L_2 представляет собой кислород, а L_1 — дифосфоглицерат.

● ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ УРАВНЕНИЕ

Для того чтобы лучше представить себе, каким образом один из лигандов влияет на связывание другого, полезно использовать другой, более общий путь анализа. Обозначим через $M^{(j)}$ все формы макромолекулы, содержащие j связанных молекул лиганда L_2 . Следовательно,

$$(M^{(j)}) = \sum_{i=0}^n (M_{ij}) \quad (15.71)$$

Используя уравнение (15.58), получаем

$$(M^{(j)}) = (M_0)(L_2)^j \sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{ij}] \quad (15.72)$$

Определим константу равновесия $\bar{K}_j$

$$\bar{K}_j = (M^{(0)})(L_2)^j / (M^{(j)}) \quad (15.73)$$

которая характеризует реакцию



Используя уравнение (15.72), можно записать константу равновесия $\bar{K}_j$ в следующем виде:

$$\bar{K}_j = \frac{\{(M_0) \sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{i0}]\} (L_2)^j}{(M_0)(L_2)^j \sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{ij}]} \quad (15.75)$$

После упрощения уравнения (15.75) получаем

$$\bar{K}_j = \frac{\sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{i0}]}{\sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{ij}]} \quad (15.76)$$

Если микроскопические константы, характеризующие связывание L_2 с M , различаются, то [по аналогии с уравнением (15.54)]

$$\sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{ij}] = (1/\tilde{K}_{0j}) [1 + (L_1)/k_{11}] [1 + (L_1)/k_{12}] \cdots [1 + (L_1)/k_{1n}]_{M^{(j)}} \quad (15.77)$$

и

$$\sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{i0}] = [1 + (L_1)/k_{11}] [1 + (L_1)/k_{12}] \cdots [1 + (L_1)/k_{1n}]_{M^{(0)}} \quad (15.78)$$

где k_{1p} — микроскопическая константа диссоциации, характеризующая связывание L_1 в центре p , и индекс $M^{(j)}$ за скобками обозначает, что микроскопическая константа относится к формам, содержащим j связанных молекул L_2 . Таким образом, в общем случае микроскопическая константа, относящаяся к связыванию L_1 , может изменяться в зависимо-

сти от числа связанных молекул L_2 . Используя уравнения (15.77) и (15.78), константу $\bar{K}_j$ в уравнении (15.76) можно представить в виде

$$\bar{K}_j = \tilde{K}_{0j} \frac{\prod_{i=1}^n (1 + (L_1)/k_{1i})_{M(0)}}{\prod_{i=1}^n (1 + (L_1)/k_{1i})_{M(j)}} \quad (15.79)$$

Согласно уравнению (15.79), $\bar{K}_j$ зависит от (L_1) , если одна или несколько микроскопических констант, характеризующих связывание L_1 , зависят от степени насыщения макромолекулы лигандом L_2 .

Взаимное влияние L_1 и L_2 можно также продемонстрировать следующим образом. Дифференцируя уравнение (15.76) и используя соотношения (15.52) и (15.53), получаем

$$\frac{d[\ln \bar{K}_j]}{d[\ln(L_1)]} = \frac{d \ln \sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{i0}]}{d[\ln(L_1)]} - \frac{d \left\{ \ln \sum_{i=0}^n [(L_1)^i / \tilde{K}_{ij}] \right\}}{d[\ln(L_1)]} \quad (15.80)$$

или

$$\frac{d[\ln \bar{K}_j]}{d[\ln(L_1)]} = -n(\bar{y}_1^{(j)} - \bar{y}_1^{(0)}) \quad (15.81)$$

где $\bar{y}_1^{(j)}$ — число молекул L_1 , связанных с макромолекулами M , которые содержат j связанных молекул L_2 . Таким образом, выражение в правой части уравнения (15.81) дает число молекул L_1 , освобождающихся при связывании j молекул L_2 с M . Однако, согласно уравнению (15.79), если

$$\prod_{i=1}^n (1 + (L_1)/k_{1i})_{M(0)} = \prod_{i=1}^n (1 + (L_1)/k_{1i})_{M(j)}$$

то $\bar{K}_j = \tilde{K}_{0j}$ и $d[\ln \bar{K}_j]/d[\ln(L_1)] = 0$. Следовательно, взаимозависимое связывание L_1 и L_2 наблюдается в том случае, когда значения микроскопических констант, характеризующих связывание лиганда одного сорта, зависят от количества связанного лиганда другого сорта.

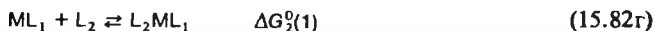
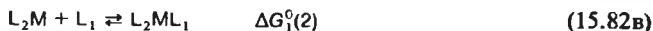
Такая взаимная зависимость при связывании лигандов хорошо иллюстрируется известным для гемоглобина эффектом Бора. В данном случае наблюдается сильное взаимное влияние при связывании с гемоглобином кислорода и «протонов Бора» (гл. 17). Другим примером является гидролиз АТФ, где как реагент, так и продукты реакции могут образовывать комплекс с Mg^{2+} и H^+ . Обзор этих интересных систем сделан Алберти (Alberty, 1969).

15.7. Энергетические аспекты взаимозависимого связывания лигандов

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Вебер (Weber, 1975) использовал другой подход для анализа взаимосвязанных равновесий между макромолекулами и лигандами, в основе которого лежат термодинамические представления. Такой анализ помогает понять энергетическую природу этих процессов.

Для иллюстрации рассмотрим простую систему, в которой макромолекула связывает одну молекулу лиганда L_1 и одну молекулу лиганда L_2 . Система описывается следующими равновесиями:



Стандартная свободная энергия для каждой реакции указана справа от равновесия; например, $\Delta G_1^0(2)$ представляет собой изменение стандартной свободной энергии при связывании L_1 с макромолекулой, насыщенной L_2 .

Величины изменения свободной энергии в уравнении (15.82) не являются независимыми, а связаны между собой:

$$\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0(1) = \Delta G_2^0 + \Delta G_1^0(2) = \Delta G^0(1,2) \quad (15.83)$$

где $\Delta G^0(1,2)$ — изменение стандартной свободной энергии для реакции



На рис. 15.8 схематически представлена связь между этими величинами. Заметим, что условие $\Delta G_1^0 = \Delta G_1^0(2)$ или $\Delta G_2^0 = \Delta G_2^0(1)$ не является обязательным и может не соблюдаться. Из уравнения (15.83) имеем

$$\Delta G_1^0(2) - \Delta G_1^0 = \Delta G_2^0(1) - \Delta G_2^0 \equiv \Delta G_{12}^0 \quad (15.85)$$

Это уравнение имеет такой же смысл, что и уравнение (15.65), описывающее взаимозависимое связывание для случая $m = n = 1$. Из него следует, что L_2 оказывает влияние (в

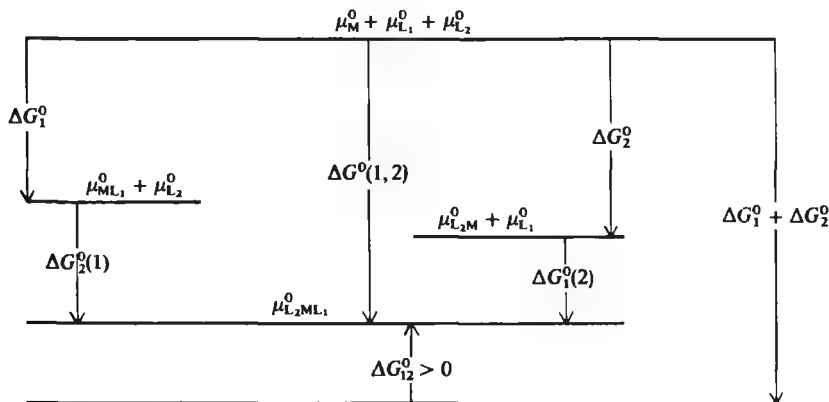


РИС. 15.8. Схематическое изображение изменения свободной энергии в системе, состоящей из двух лигандов L_1 и L_2 и макромолекулы M . Макромолекула имеет один центр для связывания каждого из лигандов. Стандартные химические потенциалы обозначены μ^0 с индексами, относящимися к отдельным формам (Weber, 1975).

смысле изменения свободной энергии) на связывание L_1 в той же степени, что и L_1 на связывание L_2 . Это взаимное влияние одного лиганда на другой может быть выражено через свободную энергию взаимодействия $\Delta G_{1,2}^0$ [определенную в уравнении (15.85)].

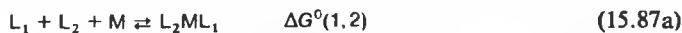
Комбинируя уравнения (15.83) и (15.85), получаем другое выражение для $\Delta G_{1,2}^0$:

$$\Delta G_{1,2}^0 = \Delta G^0(1,2) - \Delta G_1^0 - \Delta G_2^0 \quad (15.86)$$

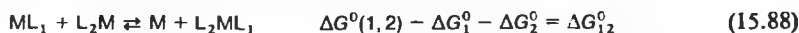
Таким образом, $\Delta G_{1,2}^0$ представляет собой разность между а) изменением стандартной свободной энергии для общего равновесия $M + L_1 + L_2 \rightleftharpoons L_2ML_1$ и б) суммой изменений стандартной свободной энергии для равновесий $M + L_1 \rightleftharpoons ML_1$ и $M + L_2 \rightleftharpoons L_2M$. Рис. 15.8 иллюстрирует определение величины $\Delta G_{1,2}^0$.

Ясно, что при $\Delta G_{1,2}^0 = 0$ взаимодействие между лигандами отсутствует; связывание каждого лиганда протекает независимым образом. В других случаях знак величины изменения свободной энергии взаимодействия определяет, является ли взаимодействие между лигандами *кооперативным* или *антагонистическим*. Если $\Delta G_{1,2}^0 < 0$, то связывание или L_1 , или L_2 облегчает присоединение другого лиганда. И наоборот, при $\Delta G_{1,2}^0 > 0$ наблюдается антагонизм при связывании лигандов.

Можно, однако, ввести свободную энергию взаимодействия и по-другому. Запишем три рассматриваемые равновесия и характеризующие их изменения свободной энергии:



Вычитая уравнения (15.87b, в) из уравнения (15.87a), получаем



Таким образом, $\Delta G_{1,2}^0$ представляет собой изменение свободной энергии для реакции типа диспропорционирования. Эта реакция характеризуется константой равновесия $K_{1,2}$, которая равна

$$K_{1,2} = e^{-\Delta G_{1,2}^0/RT} = (L_2ML_1)/(ML_1)(L_2M) \quad (15.89)$$

Из данного анализа видно, что при $\Delta G_{1,2}^0 < 0$ $K_{1,2} > 1$ и, следовательно, формы L_2ML_1 и M преобладают по сравнению с частично насыщенными формами ML_1 и L_2M . При $\Delta G_{1,2}^0 > 0$ наблюдается обратная картина.

ВЛИЯНИЕ ЭНЕРГИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СВЯЗАННЫХ ЛИГАНДОВ

Представляет интерес проанализировать, какую величину должна иметь $\Delta G_{1,2}^0$ для того, чтобы распределение L_1 и L_2 между формами ML_1 , L_2M и L_2ML_1 изменилось в значительной степени по сравнению с распределением лигандов при независимом связывании ($\Delta G_{1,2}^0 = 0$). Определим степени насыщения макромолекулы y_1 , y_2 и $y_{1,2}$:

$$\bar{y}_1 = [(L_2ML_1) + (ML_1)]/(M)_{\text{общ}} \quad (15.90a)$$

$$\bar{y}_2 = [(L_2ML_1) + (L_2M)]/(M)_{\text{общ}} \quad (15.90b)$$

$$\bar{y}_{1,2} = (L_2ML_1)/(M)_{\text{общ}} \quad (15.90b)$$

где $(M)_{\text{общ}} = (M) + (ML_1) + (L_2M) + (L_2ML_1)$. Ясно, что $\bar{y}_1$ и $\bar{y}_2$ — это степень насыщения макромолекулы лигандом L_1 и L_2 соответственно и y_{12} — степень насыщения обоими лигандами.

Рассмотрим случай, когда (L_1) и (L_2) подобраны так, что заняты половина центров связывания L_1 и половина центров связывания L_2 . Легко показать (см. задачу 15.4), что при этих условиях

$$K_{12} = \bar{y}_{12}^2 / [(1/2) - \bar{y}_{12}]^2 \quad (15.91)$$

$$\bar{y}_{12} = (1/2)K_{12}^{1/2} / (1 + K_{12}^{1/2}) \quad (15.92)$$

Подставляя уравнение (15.91) в уравнение (15.89), получаем

$$\Delta G_{12}^0 = -2RT \ln[2\bar{y}_{12} / (1 - 2\bar{y}_{12})] \quad (15.93)$$

Используя уравнение (15.93), мы можем построить график зависимости ΔG_{12}^0 от $2\bar{y}_{12}$ (рис. 15.9). Когда $2\bar{y}_{12} = 1$, все связанные лиганды находятся в форме L_2ML_1 . Когда $2\bar{y}_{12} = 0$, все связанные лиганды находятся в форме ML_1 и L_2M . Видно, что в точке $2\bar{y}_{12} = 0,5$ $\Delta G_{12}^0 = 0$ (нет взаимодействия между лигандами); такой результат вполне вероятен для простого, свободного от влияния каких-либо факторов статистического распределения лигандов между формами ML_1 , L_2M и L_2ML_1 в предположении, что все формы присутствуют в равных количествах. Заметим, что график на рис. 15.9 является симметричным относительно точки $2\bar{y}_{12} = 0,5$.

Когда $\Delta G_{12}^0 = -2$ ккал/моль, $2\bar{y}_{12} > 0,8$; когда $\Delta G_{12}^0 = -3$ ккал/моль, $2\bar{y}_{12} > 0,9$. В последнем случае более 90% связанных L_1 и L_2 находятся в форме L_2ML_1 . В этом примере при связывании лигандов образуется в основном форма L_2ML_1 и в незначительных количествах — формы ML_1 и L_2M . И наоборот, когда $\Delta G_{12}^0 = +2$ или $+3$ ккал/моль, в области полунасыщения большая часть связанных лигандов находится в виде форм ML_1 и L_2M . Таким образом, энергия взаимодействия, составляющая по величине только около ± 2 ккал/моль, является достаточной, чтобы вызвать значительное изменение распределения форм макромолекулы, содержащих связанные лиганды, по сравнению со статистическим.

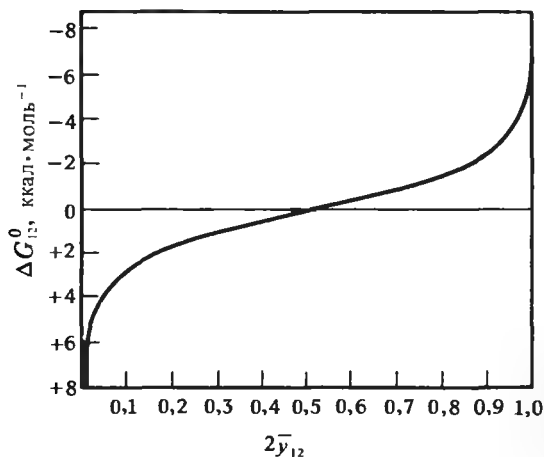


РИС. 15.9. Связь между степенью насыщения макромолекулы двумя лигандами (y_{12}) и изменением свободной энергии взаимодействия (ΔG_{12}^0), когда степень насыщения каждым из лигандов (y_1, y_2) равна 0,5 (Weber, 1975).

ВЕЛИЧИНЫ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, ОБНАРУЖЕННЫЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

В табл. 15.1 приведен ряд величины изменения свободной энергии взаимодействия для связывания двух различных лигандов с некоторыми белками. Обнаружено, что свободная энергия взаимодействия имеет как положительное, так и отрицательное значение, что соответствует антагонистическому и кооперативному эффектам. Все найденные величины свободной энергии лежат в интервале от 0 до $\pm 2,5$ ккал/моль. Следует отметить, однако, что полученные данные не многочисленны и дальнейшие исследования, по-видимому, расширят область значений ΔG_{12}^0 . По крайней мере в некоторых случаях энергия взаимодействия достаточно велика, чтобы вызвать вполне заметное изменение кривых насыщения макромолекулы лигандом, которое можно было ожидать на основании графика на рис. 15.9. Примеры изменения кривых насыщения демонстрируются в гл. 17, где обсуждается взаимодействие лигандов при их связывании с аспартат-карбамоилтрансферазой и гемоглобином.

Таблица 15.1

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЛИГАНДАМИ¹⁾

Белок	Пара лигандов	ΔG_{12}^0 , ккал/моль
Гемоглобин	Кислород, 2,3-дифосфоглицерат	+ 1,3
Гемоглобин	Кислород, инозитолгексафосфат	+ 2,3
Сывороточный альбумин, бычий	1-анилинонафталин-8-сульфонат, 3,5-диоксibenзоат	+ 1,5
Пируваткиназа	Фосфоенолпируват, K^+	- 1,2
Пируваткиназа	K^+ , Mn^{2+}	- 1,4
Пируваткиназа	Фенилаланин, Mn^{2+}	+ 0,8
Аспартат-карбамоилтрансфераза	СТР, сукцинат	+ 0,5
Лактатдегидрогеназа из сердца цыпленка	NADH, оксалат	- 1,5

¹⁾ Weber G., Adv. Protein Chem., 29, 1, 1975.

15.8. Взаимодействие больших лигандов с кристаллоподобными структурами

При рассмотрении равновесий между макромолекулами и лигандами в биологических системах особый интерес представляет случай связывания больших лигандов с кристаллоподобными структурами, такими, например, как двухцепочечные нуклеиновые кислоты. К большим лигандам относятся полиамины (спермин и спермидин), гистоны, ДНК-раскручивающие белки и многие лекарственные вещества (например, актиномицин D). Рассматриваемые в данном разделе системы имеют особые статистические свойства и значительно отличаются от разобранных выше примеров. Кроме того, они лучше поддаются прямому анализу, который мы проводим, придерживаясь подхода, разработанного Мак-Ги и фон Хиппелем (McGhee, von Hippel, 1974).

ОДНОРОДНАЯ КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ РЕШЕТКА: СТАТИСТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Вначале рассмотрим однородную кристаллическую решетку, которая построена из N идентичных повторяющихся элементов. Например, в спиральной нуклеиновой кислоте повторяющимися элементами служат фосфатные группы или остатки сахара. Допустим, что одна молекула лиганда L занимает l расположенных последовательно элементов решетки; насыщение решетки лигандом L приводит к связыванию N/l молекул лиганда на молекулу, играющую роль решетки. Предполагается, что лиганд может занять любые l последовательных элементов решетки, поэтому на полностью свободной решетке имеется $N - l + 1$ потенциальных центров, которые может занять первая связывающаяся молекула лиганда. Таким образом, в начале титрования число потенциальных центров связывания L много больше, чем число центров N/l , которые могут быть заняты при насыщении. Из-за этой особенности данная ситуация резко отличается от приведенного ранее случая идентичных и независимых центров [уравнение (15.12)], в котором число свободных центров (n) на M_0 соответствует числу центров, занятых на M_n . Благодаря этому связывание на кристаллоподобных структурах приводит к графику Скэтчарда, который значительно отличается от получаемого в случае простой системы [уравнение (15.12)].

Рис. 15.10 наглядно показывает статистические сложности, возникающие при анализе связывания лиганда на решетке, для $N = 12$ и $l = 3$. Обозначим через ν число молей L , связанных на моль решетки. При насыщении одна решетка связывает ($\nu = N/l = 4$) четыре молекулы лиганда. Однако в начале титрования решетка имеет $N - l + 1 = 10$ потенциальных центров связывания. Рисунок показывает, что после связывания двух молекул лиганда на решетку ($\nu = 2$) образуется несколько микроформ. В одном случае лиганды располагаются таким образом, что решетка уже не может связать ни одного дополнительно-

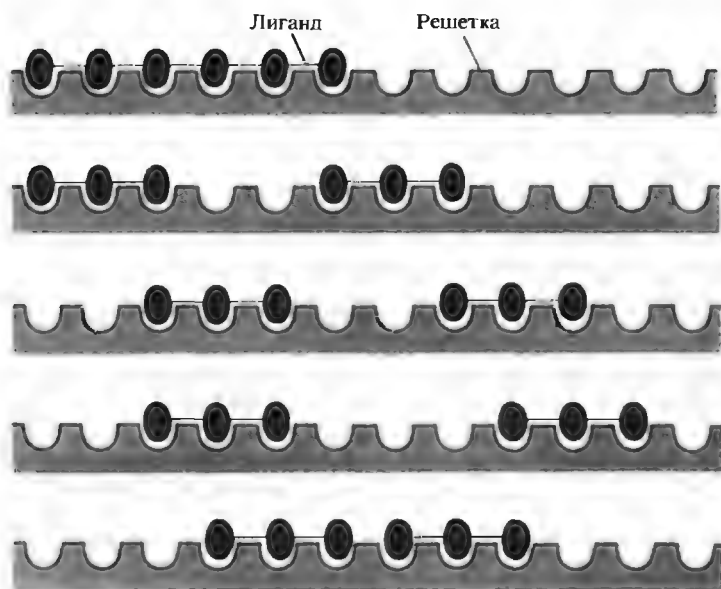


РИС. 15.10. Некоторые микроформы, образующиеся при связывании двух молекул лиганда на решетке при условии $l = 3$ и $N = 12$.

го лиганда, тогда как в другом остаются места для присоединения еще двух лигандов. Все эти формы находятся в равновесии со свободным лигандом, и они должны учитываться при любом анализе формы кривой насыщения. При дальнейшем связывании ($\nu > 2$) должно происходить непрерывное перераспределение лиганда на решетке до тех пор, пока не установится конечное состояние ($\nu = 4$).

РАСЧЕТ ХАРАКТЕРИСТИК СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ

Для того чтобы рассчитать характеристики связывания лиганда на решетке, начнем с основного соотношения

$$\nu = \bar{N}_{fl}(L)/k \quad (15.94)$$

где $\bar{N}_{fl}$ — среднее число свободных центров, связывающих лиганд и имеющих длину l в расчете на решетку; k — микроскопическая константа диссоциации. Уравнение (15.94) следует непосредственно из определения k . Наша основная задача состоит в том, чтобы получить выражение для $\bar{N}_{fl}$. Сначала рассчитаем величину p_l — вероятность того, что l расположенных последовательно элементов решетки, начиная с любого положения на ней, не заняты лигандом; эта вероятность, умноженная на N , дает среднее число свободных лигандсвязывающих центров длиной l на одной решетке.

Вероятность p_l можно записать следующим образом:

$$p_l = p_f p_{ff}^{l-1} \quad (15.95)$$

где p_f — вероятность того, что произвольно выбранный элемент решетки не занят лигандом; p_{ff} — условная вероятность того, что за данным свободным элементом решетки следует другой незанятый элемент. Так как доля занятых элементов решетки равна $\nu l/N$, доля свободных элементов равна $1 - \nu l/N$; поэтому p_b (вероятность появления занятого элемента) равна $\nu l/N$ и $p_f = 1 - \nu l/N$.

Условная вероятность p_{ff} представляет собой также долю свободных элементов решетки, находящихся перед незанятыми элементами. Эта величина равна разности между общим числом свободных элементов решетки и числом свободных элементов, стоящих перед занятым, деленной на общее число свободных элементов решетки:

$$p_{ff} = [p_f - (p_b/l)p_{bf}]/p_f \quad (15.96)$$

где p_{bf} — условная вероятность того, что за последней (l -й) частью молекулы связанного лиганда следует свободный элемент решетки, и p_b/l — вероятность того, что элемент решетки занят последней (l -й) частью молекулы лиганда. Поскольку между связанными лигандами взаимодействия нет, $p_{ff} = p_{bf}$. Используя это соотношение, уравнение (15.96) можно преобразовать к следующему виду:

$$p_{ff} = p_f/(p_f + p_b/l) \quad (15.97)$$

или

$$p_{ff} = \frac{1 - lv/N}{1 - (l-1)v/N} \quad (15.98)$$

Теперь легко получить выражение для $\bar{N}_{fl}$:

$$\bar{N}_{fl} = N p_l = N (1 - lv/N) \left(\frac{1 - lv/N}{1 - (l-1)v/N} \right)^{l-1} \quad (15.99)$$

Уравнение (15.99) получено с использованием соотношения (15.95) для p_l и выражений для

p_f и p_{ff} . Подставляя уравнение (15.99) в уравнение (15.94), получаем

$$v/(L) = \frac{N(1 - lv/N)}{k} \left(\frac{1 - lv/N}{1 - (l-1)v/N} \right)^{l-1} \quad (15.100)$$

Уравнение (15.100) представляет собой соотношение, которое мы хотели получить. Заметим, что при выводе этого уравнения не учитывались концевые эффекты, поэтому, строго говоря, оно справедливо только для решетки, состоящей из бесконечно большого числа элементов. Однако, как будет показано в следующем разделе, уравнение (15.100) позволяет достаточно точно описать многие экспериментально интересные системы, включая решетки, состоящие из ограниченного числа элементов.

НЕЛИНЕЙНЫЕ ГРАФИКИ СКЭТЧАРДА КАК СЛЕДСТВИЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ

Уравнение (15.100) можно сравнить с соответствующим уравнением (15.29) для связывания L на l идентичных, независимых центрах макромолекулы, для которых не действует эффект «перекрывания». Когда $l = 1$, уравнение (15.100) сводится к уравнению (15.29). (Отметим, что при $l = 1$ l в уравнении (15.29) равно N в уравнении (15.100); а вообще $n = N/l$.) Однако, когда $l > 1$, последний множитель в уравнении (15.100) всегда меньше единицы и изменяется в зависимости от величины v . Это приводит к заметной нелинейности графиков Скэтчарда, отражающих зависимость $v/(L)$ от v ; в данном случае графики для $l > 1$ всегда расположены ниже прямой для $l = 1$.

На рис. 15.11 представлены некоторые расчетные графики Скэтчарда для значений l от 1 до 20 при $k = 1$ М. Для того чтобы кривые легче было сравнивать, абсцисса дана в единицах $1/l$. Во всех случаях полное насыщение решетки достигается при $v = n = N/l$. Однако по мере увеличения l вогнутость кривых становится все более очевидной. Это объясняется тем, что при насыщении решетки возникают затруднения энтропийного характера, которые становятся все более отчетливо выраженными по мере увеличения l . Таким образом, статистически большое число микросостояний, которые образуются при данной степени частичного насыщения, определяет сильный энтропийный вклад в свободную энергию

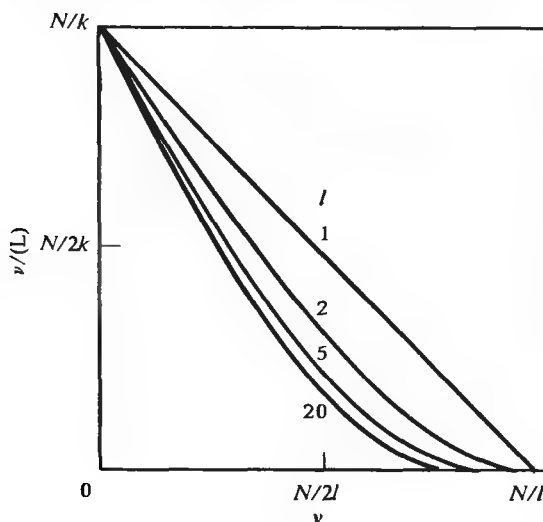


РИС. 15.11. Графики Скэтчарда в случае связывания лиганда на решетке для различных значений l и $k = 1$ М (McGhee, von Hippel, 1974).

связывания. Этот эффект, конечно, утрачивается, когда связывание протекает с полностью насыщенной решеткой, включающей только одно микросостояние. В результате насыщение решетки большими лигандами достигнуть практически невозможно; например, при значении l от 10 до 20 величина (L) должна измениться от 10 до 100 раз, для того чтобы насыщение решетки лигандом увеличилось только от 80 до 90%.

Точка пересечения графика Скэтчарда с осью ν дает величину N/l , которая соответствует l в уравнении (15.29). Однако точка пересечения кривой с осью $\nu/(L)$ дает N/k , которая не является той же величиной, что l/k — точка пересечения графика с осью ординат согласно уравнению (15.29). Это обстоятельство следует учитывать при расчете из графика Скэтчарда параметров связывания лиганда с кристаллоподобными структурами.

НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА РЕАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

На рис. 15.12 показаны некоторые экспериментальные данные: график Скэтчарда для связывания ϵ -динитрофенильного производного олиголизина [ϵ -ДНФ-Lys-(Lys)₅] со спиралью poly(rI): poly(rC). Сплошная кривая рассчитана по уравнению (15.100) для $l = 7,8$ и $k = 7,1$ мкМ. Точка полного насыщения обозначена стрелкой. Из рисунка видно, что получено превосходное соответствие между расчетными и экспериментальными данными. Штриховые кривые показывают чувствительность расчетных кривых к изменению l при постоянном значении k . Ясно, что изменение l только на ± 1 от значения, соответствующего наилучшему совпадению, приводит к значительному отклонению расчетной кривой от экспериментальной.

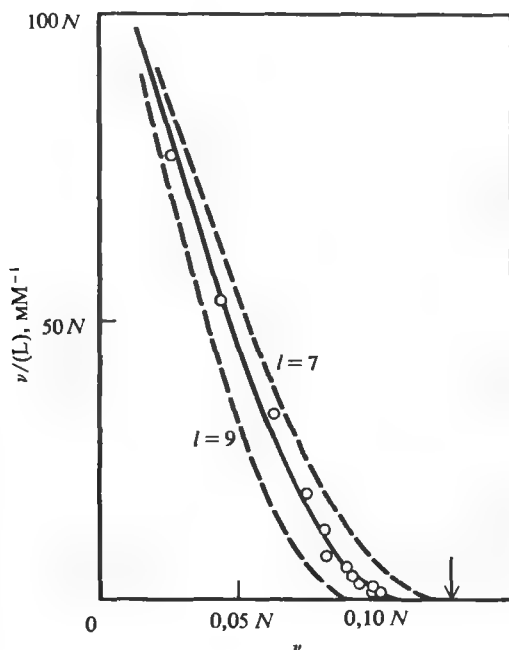


РИС. 15.12. Графики Скэтчарда для связывания ϵ -ДНФ-Lys-(Lys)₅ со спиралью poly(rI): poly(rC). Точки соответствуют значениям, найденным в эксперименте. Сплошная кривая рассчитана по уравнению (15.100) при $l = 7,8$ и $k = 7,1$ мкМ. Штриховые кривые рассчитаны при том же значении k для $l = 7$ или $l = 9$. Стрелкой обозначена точка насыщения решетки лигандом (McGhee, von Hippel, 1974).

Если на решетке связывается смесь лигандов, то уравнение (15.100) можно использовать для анализа такого случая после небольшой модификации. Введя индекс i при параметрах, относящихся к каждому лиганду, получаем

$$v_i/(L_i) = \frac{N \left(1 - \sum_i l_i v_i / N \right)}{k_i} \left(\frac{1 - \sum_i l_i v_i / N}{1 - \sum_i (l_i - 1) v_i / N} \right)^{l_i - 1} \quad (15.101)$$

Это уравнение применяют, когда имеются независимые способы измерения связывания каждого из лигандов. Например, если с помощью диализа изучается связывание со спиральным полинуклеотидом двух разных полиаминов (таких, как спермин и спермидин), уместно использовать ^{14}C -метку для одного полиамина и ^3H -метку для второго. В других случаях можно применять лиганды, различающиеся по положению полос поглощения в оптическом диапазоне.

РЕШЕТКИ ОГРАНИЧЕННОЙ ДЛИНЫ И КОНЦЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ

Уравнения (15.100) и (15.101), строго говоря, справедливы только для предельного случая, когда N стремится к бесконечности, так как при их выводе не учитывались концевые эффекты. Мы можем оценить поправочный коэффициент для любого конечного значения N . Допустим, что $v/N = v_N$ — плотность насыщения решетки, состоящей из N элементов, и v_∞ — плотность насыщения решетки, состоящей из бесконечно большого числа элементов. Тогда уравнение (15.100) можно записать в следующей форме:

$$v_x/(L) = \frac{1 - lv_x}{k} \left(\frac{1 - lv_x}{1 - (l - 1)v_x} \right)^{l - 1} \quad (15.102)$$

Для решетки, состоящей из бесконечно большого числа элементов, каждый ее элемент имеет среднюю плотность насыщения v_∞ ; для решетки из ограниченного числа элементов это справедливо для всех элементов, за исключением $l - 1$ элементов с каждого конца, которые могут иметь среднюю плотность насыщения меньше чем v_∞ . При $(L) \rightarrow \infty$ величина v_N/v_∞ стремится к отношению (целочисленная часть N/l)/(N/l). Например, если $l = 3$ и $N = 100$, то $v_N/v_\infty = 0,99$. В другом крайнем случае

$$v_N \rightarrow [(N - l + 1)/N] v_\infty \quad \text{при } (L) \rightarrow 0 \quad (15.103)$$

где $N - l + 1$ — число потенциальных лигандсвязывающих центров длиной l на свободной решетке. Так, например, при $l = 3$ и $N = 100$ $v_N/v_\infty = 0,98$. Из этих и подобных расчетов мы приходим к заключению, что для значений $N/l \geq 30$ уравнение (15.100) применимо для описания связывания лигандов на решетке из ограниченного числа элементов с точностью большей, чем экспериментальная.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ЛИГАНДАМИ

В некоторых случаях связывание лиганда на решетке происходит кооперативно. Такое связывание имеет место при взаимодействии некоторых белков с ДНК. Подобные ситуации также можно анализировать, используя приведенные выше формулы. Для этого мы должны ввести параметр, который учитывает взаимодействие между лигандами на ре-

шетке. Рассмотрим две частично насыщенные микроформы решетки с одинаковым числом связанных лигандов. Предположим, что распределение этих лигандов строго одинаково, за исключением того, что пара изолированных (не соприкасающихся) лигандов на решетке А образует пару соприкасающихся лигандов на решетке В, т.е. на этой решетке вводится только одно новое взаимодействие между лигандами. Для равновесия между микроформами решетки А и В имеем

$$\omega = (B)/(A) \quad (15.104)$$

Способом, аналогичным использованному для вывода уравнения (15.100), получаем

$$\frac{v}{(L)} = \frac{N(1 - lv/N)}{k} \left(\frac{(2\omega + 1)(1 - lv/N) + v/N - R}{2(\omega - 1)(1 - lv/N)} \right)^{l-1} \left(\frac{1 - (l + 1)v/N + R}{2(1 - lv/N)} \right)^2 \quad (15.105)$$

где

$$R = \{[1 - (l + 1)v/N]^2 + (4\omega v/N)(1 - lv/N)\}^{1/2} \quad (15.106)$$

Более полный вывод этого уравнения см. в работе McGhee, von Hippel, 1974.

Можно показать, что при $\omega = 1$ уравнение (15.105) сводится к уравнению (15.100). Когда $\omega < 1$ (антикооперативное связывание), графики Скэтчарда, согласно уравнению (15.105), расположены ниже соответствующих кривых для случая невзаимодействующих лигандов [уравнение (15.100)]. Когда $\omega = 0$ (бесконечно большая антикооперативность), уравнение (15.105) сводится к уравнению (15.100) для случая невзаимодействующих лигандов, состоящих из $l + 1$ частей. Когда $\omega > 1$, графики Скэтчарда являются выпуклыми и расположены выше кривых, соответствующих случаю невзаимодействующих лигандов. На рис. 15.13 представлены такие графики для различных значений ω при $l = 1$ и $k = 1$ М.

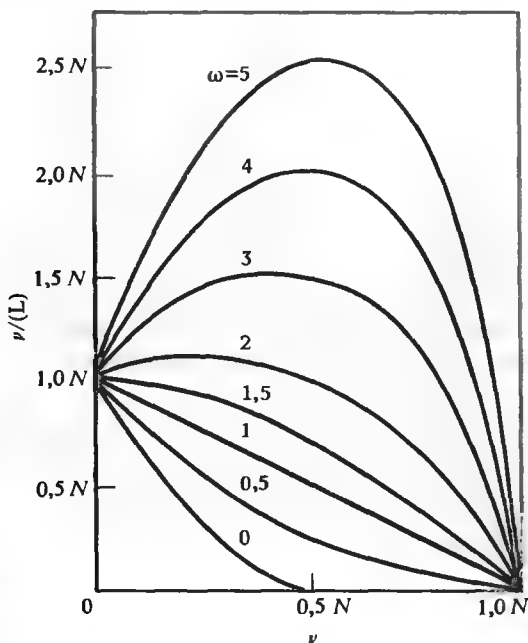


РИС. 15.13. График Скэтчарда в случае связывания лиганда на однородной решетке при условии $k = 1$ М и $l = 1$ для различных значений параметра кооперативности ω (McGhee, von Hippel, 1974).

Поскольку эти кривые построены для $l = 1$, здесь нет эффекта «перекрывания», который можно спутать с кооперативностью. Как показано ранее (рис. 15.11), увеличение l приводит к появлению признаков антикооперативности при связывании. Когда $\omega > 1$ и $l > 1$, кривая, очевидно, представляет собой результат компромисса между влиянием этих двух величин.

Согласно уравнению (15.105), точка пересечения графика Скэтчарда с осью $\nu/(L)$ дает N/k . Эту же величину получают в случае системы с не взаимодействующими лигандами, описываемой уравнением (15.100). Кроме того, точка пересечения кривой с осью ν по-прежнему дает величину N/l . Однако, когда $\omega > 1$, насыщение решетки при любом данном значении n достигается легче, чем в случае не взаимодействующих лигандов ($\omega = 1$). где насыщение затрудняется из-за наличия энтропийных эффектов

Такой анализ связывания лиганда на однородной решетке применим к ряду ситуаций, встречающихся на практике. Хотя для анализа связывания лиганда на гетерогенных решетках, которые имеют лигандсвязывающие центры более одного типа, должен быть использован другой подход, приведенный выше анализ показывает, что нелинейные области на графиках Скэтчарда в значительной мере могут объясняться эффектом «перекрывания». Гетерогенность решетки необходимо учитывать только тогда, когда наблюдаются эффекты, не предсказываемые уравнением (15.100) или (15.105). Такой анализ требует дальнейшего развития теории.

В гл. 23, где рассматривается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами, мы остановимся на другом типе анализа связывания лиганда на решетке, основанном на использовании матричных методов.

Краткие выводы

Взаимодействия макромолекул с лигандами широко распространены в биохимических системах. Для анализа равновесных свойств разнообразных систем разработан обширный и удобный математический аппарат. При таком анализе очень важно учитывать различие между микроскопическими и макроскопическими константами и связанные с этим статистические особенности систем. В простейших системах лиганды связываются в идентичных независимых центрах одного типа; такие системы удобно анализировать, используя график Скэтчарда. Модифицированный метод анализа с использованием графиков Скэтчарда может быть полезен и в случае связывания лиганда с макромолекулой, имеющей независимые центры нескольких типов.

Во многих биологических системах при связывании лиганда одного сорта с макромолекулой имеет место взаимодействие центров. Обычно обнаруживают кооперативные взаимодействия между центрами, и их можно проанализировать разработанными методами. Другим типом взаимодействия является взаимодействие между центрами одной и той же макромолекулы, в которых связываются лиганды разного сорта. В этом случае особенно интересны и полезны уравнения, описывающие взаимное влияние лигандов на их связывание. Энергия взаимодействия, характеризующая такое влияние, обычно составляет от 0 до $\pm 2,5$ ккал/моль.

Еще одним случаем, представляющим значительный интерес, является взаимодействие больших лигандов с кристаллоподобными структурами, такими, как спиральная ДНК. В подобных системах главную роль в определении характера наблюдаемого связывания играют статистические энтропийные эффекты.

Задачи

15.1. Уравнение (15.20) полезно для многих расчетов. Докажите справедливость этого соотношения.

15.2. Лиганд связывается в четырех центрах макромолекулы. Кажущиеся макроскопические константы диссоциации K_2 и K_3 одинаковы (в пределах экспериментальной ошибки). Имеется ли взаимодействие между центрами 2 и 3? Если нет, то почему? Если имеется, то рассчитайте энергию взаимодействия.

15.3. Макромолекула имеет шесть центров связывания лиганда L. Исследователь может определить три макроскопические константы диссоциации, характеризующие связывание лиганда, K_1 , K_4 и K_5 . Он нашел, что $K_5 = 15 K_1$ и $K_4 = 8 K_1$. Он утверждает, что этот результат ясно показывает отрицательное (антикооперативное) взаимодействие между центрами и что график Скэтчарда для этой системы, несомненно, представляет собой выпуклую кривую. Оппонент не соглашается с исследователем и говорит, что имеющиеся данные указывают на отсутствие взаимодействия между центрами и что он попытается предсказать относительные значения K_i для других констант. Кто из них прав и почему? Можно ли предсказать значения других K_i ? Если да, то сделайте это. Если нет, то объясните, почему нельзя предсказать значения других констант.

15.4. Рассмотрите случай связывания с макромолекулой двух лигандов, L_1 и L_2 . Пусть половина L_1 -связывающих и L_2 -связывающих центров заполнены. Используя уравнения (15.89) и (15.90), выведите уравнения (15.91), (15.92) и (15.93).

15.5. Уравнение (15.54) показывает, что существует простая связь между микроскопическими константами диссоциации k_i и макроскопическими константами диссоциации $\bar{K}_i$, определенными уравнением (15.51). Покажите справедливость уравнения (15.54) для случая трех микроскопических констант k_1 , k_2 и k_3 и трех макроскопических констант $\bar{K}_1$, $\bar{K}_2$ и $\bar{K}_3$ и подумайте, почему уравнение (15.54) имеет очень простую форму.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Alberty R. A., Daniels F., 1979. Physical Chemistry, 5th ed., New York, Wiley. [Гл. 4 и 6 являются хорошим введением в анализ химических и биохимических равновесий.]
- McGhee J. D., von Hippel P. H., 1974. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice, J. Mol. Biol., 86, 469. [Очень наглядно описано взаимодействие лигандов с кристаллоподобными структурами. С точки зрения физического смысла обсуждаются некоторые сложные статистические вопросы этих взаимодействий.]
- Wyman J., Jr., 1964. Linked function and reciprocal effects in hemoglobin: A second look, Adv. Protein Chem., 19, 223. [Классическая статья по анализу равновесий при связывании лигандов с макромолекулами, в которой приводятся уравнения, описывающие взаимное влияние лигандов при связывании.]

Специальная

- Alberty R. A., 1969. Thermodynamics of the hydrolysis of adenosine triphosphate, J. Chem. Ed., 46, 713.
- Hess V. L., Szabo A., 1979. Ligand binding to macromolecules: Allosteric and sequential models of cooperativity, J. Chem. Ed., 56, 289. [Использование производящих функций для анализа систем макромолекула — лиганд.]

- Hill A. V.*, 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves, *J. Physiol.*, London, 40, iv.
- Scatchard G.*, 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660.
- Schimmel P. R.*, 1976. Equilibrium and kinetic studies of the cooperative interaction of cations with transfer RNA, *J. Polymer Sci. Symp.*, No. 54, p. 387.
- Strandberg M. W. P.*, 1979. Linear differential equations in chemical equilibrium calculations, *J. Chem. Phys.*, **71**, 4765. Рассматриваются некоторые общие свойства систем макромолекула — лиганд с использованием дифференциальных уравнений.]
- Tanford C.*, 1961. *Physical Chemistry of Macromolecules*, New York, Wiley. [Имеется перевод: Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1965. В гл. 8 на ряде примеров дан анализ множественных равновесий и других сложных систем.]
- Weber G.*, 1975. Energetics of ligand binding to proteins, *Adv. Proteins. Adv. Protein Chem.*, **29**, 1.

Глава 16 *Кинетика взаимодействия лигандов с макромолекулами*

16.1. Исследование кинетики биохимических процессов

Изучение взаимодействия лигандов с макромолекулами с равновесной точки зрения (гл. 15) дает представление о термодинамических характеристиках и общем механизме этих процессов. Однако для понимания детального механизма взаимодействий недостаточно только одних равновесных измерений. Вообще говоря, имеется множество реакционных схем, которые могут объяснить данный набор термодинамических данных. Часто эти схемы можно расклассифицировать, изучая динамику (или кинетику) реакций взаимодействия лигандов с макромолекулами. Такие исследования позволяют не только установить пути протекания реакций, но они также дают количественное представление о масштабе времени элементарных стадий; на основе полученных данных можно сделать вывод о молекулярном механизме реакций.

Все биохимические системы проявляют динамические свойства. Во многих случаях само физиологическое свойство является по существу динамическим свойством, как, например, в случае ферментативного катализа, активного транспорта ионов через мембрану, подавления и активации экспрессии генов и т.д. Поэтому изучение динамических свойств биохимических систем уже в течение многих лет привлекает к себе большое внимание.

В этой главе мы обсудим некоторые основные характеристики кинетических систем. Многие представления и уравнения, изложенные здесь, используются и в других главах этой книги. Например, в гл. 21, где обсуждаются механизмы укладки полипептидных цепей молекул белка, кинетические аспекты имеют большое значение. В дальнейшем обсуждении большая часть материала будет относиться к ферментативным реакциям, которые с кинетической точки зрения исследованы более подробно по сравнению с любым другим классом биохимических систем. В качестве конкретного примера того, каким образом объединение кинетического и других подходов приводит к пониманию молекулярных основ взаимодействия лигандов с макромолекулами, обсуждается рибонуклеаза А как наиболее детально исследованный белок.

При изучении ферментативных реакций кинетические исследования проводят, как правило, в условиях, при которых свободный фермент и его промежуточные формы находятся в стационарном состоянии. Это позволяет значительно упростить уравнения для скорости реакций, но приводит к потере значительной части информации о механизме процесса и промежуточных формах фермента. Поэтому более тонкие кинетические исследования включают определение предстационарных характеристик системы. Этот подход более сложен технически, и к тому же при его использовании требуется трудоемкий математический анализ кинетических кривых. Исследования предстационарной кинетики значительно упрощают релаксационные методы, которые стали очень популярны в последние годы.

Прежде чем рассматривать некоторые важные особенности предстационарной и стационарной кинетики, полезно вначале обсудить общие характеристики ферментных и связанных с ними кинетических систем. В частности, важно оценить сложности, присущие некоторым даже относительно простым кинетическим системам. В связи с этим будут очевидны упрощенность и серьезные ограничения, к которым приводит допущение о стационарности, и становятся ясными важность и преимущества специальных методов, таких, как релаксационная спектроскопия.

16.2. Мономолекулярные реакции

ОДНОСТАДИЙНЫЕ РЕАКЦИИ

Наиболее простыми обратимыми реакциями являются мономолекулярные процессы, такие, как конформационные изменения молекул белка. Рассмотрим в качестве примера реакцию



где X_0 и X_1 представляют собой два разных конформационных состояния молекулы белка. Уравнение скорости для такой схемы имеет следующий вид:

$$-d(X_0)/dt = k_1(X_0) - k_{-1}(X_1) \quad (16.2)$$

Это уравнение легко решить, используя замену переменных; пусть $\Delta(X_0) = (X_0) - (\overline{X_0})$ и $\Delta(X_1) = (X_1) - (\overline{X_1})$, где черта над символом обозначает равновесную концентрацию. Поскольку уравнение материального баланса требует, чтобы суммарная концентрация X , $(X)_0 = (X_0) + (X_1)$, оставалась постоянной, $\Delta(X_0) = -\Delta(X_1)$. Поэтому уравнение (16.2) можно записать в следующем виде:

$$d\Delta(X_0)/dt = -\lambda \Delta(X_0) \quad (16.3)$$

или

$$\Delta(X_0) = \Delta(X_0)^0 e^{-\lambda t} \quad (16.4)$$

где $\lambda = k_1 + k_{-1}$ и $(X_0)^0$ — отклонение (X_0) от ее равновесного значения при $t = 0$. Уравнение (16.4) можно также записать в следующей форме:

$$(X_0) = (\overline{X_0}) + \Delta(X_0)^0 e^{-\lambda t} \quad (16.5)$$

Таким образом, в зависимости от начальных условий, для простой обратимой мономолекулярной реакции (X_0) экспоненциально растет или уменьшается до ее равновесного значения.

ДВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

Рассмотрим достаточно простую мономолекулярную схему, включающую две последовательные реакции:



Используя изменения концентраций $\Delta(X_0)$, $\Delta(X_1)$ и $\Delta(X_2)$, мы можем записать уравнения скорости в следующем виде:

$$-d\Delta(X_1)/dt = -k_1 \Delta(X_0) + (k_{-1} + k_2) \Delta(X_1) - k_{-2} \Delta(X_2) \quad (16.7a)$$

$$-d\Delta(X_2)/dt = -k_2 \Delta(X_1) + k_{-2} \Delta(X_2) \quad (16.7b)$$

На основании уравнения материального баланса $\Delta(X_0) = -[\Delta(X_1) + \Delta(X_2)]$ мы получаем

$$-d\Delta(X_1)/dt = a_{11} \Delta(X_1) + a_{12} \Delta(X_2) \quad (16.8a)$$

$$-d\Delta(X_2)/dt = a_{21} \Delta(X_1) + a_{22} \Delta(X_2) \quad (16.8b)$$

где $a_{11} = k_1 + k_{-1} + k_2$; $a_{12} = k_1 - k_{-2}$; $a_{21} = -k_2$; $a_{22} = k_{-2}$.

Заметим, что реакцию схему (16.6) характеризуют только два уравнения скорости. Хотя можно написать выражение для $-d\Delta(X_0)/dt$, на основании уравнения материального баланса оно представляет собой просто сумму $d\Delta(X_1)/dt + d\Delta(X_2)/dt$. В общем случае число уравнений скорости, описывающих некоторую реакцию схему, соответствует числу *независимых* стадий.

Выражения (16.8) представляют собой систему двух линейных дифференциальных уравнений. Стандартный подход к решению таких уравнений заключается в нахождении решений, имеющих следующий вид:

$$\Delta(X_1) = C_1 e^{-\lambda t} \quad (16.9a)$$

$$\Delta(X_2) = C_2 e^{-\lambda t} \quad (16.9b)$$

где C_1 , C_2 и λ — параметры, которые надо определить. При дифференцировании уравнений (16.9) получаем

$$-d\Delta(X_1)/dt = \lambda \Delta(X_1) \quad (16.10a)$$

$$-d\Delta(X_2)/dt = \lambda \Delta(X_2) \quad (16.10b)$$

Подстановка уравнений (16.10) в уравнения (16.8) приводит к следующим выражениям:

$$0 = (a_{11} - \lambda) \Delta(X_1) + a_{12} \Delta(X_2) \quad (16.11a)$$

$$0 = a_{21} \Delta(X_1) + (a_{22} - \lambda) \Delta(X_2) \quad (16.11b)$$

Чтобы решить такую систему однородных линейных уравнений, нужно приравнять нулю определитель, составленный из коэффициентов этих уравнений:

$$\begin{vmatrix} a_{11} - \lambda & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - \lambda \end{vmatrix} = 0 \quad (16.12)$$

или

$$\lambda^2 - (a_{11} + a_{22})\lambda + a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} = 0 \quad (16.13)$$

Корни этого квадратного уравнения равны

$$\lambda_{1,2} = [(a_{11} + a_{22})/2] \{1 \pm [1 - 4(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21})/(a_{11} + a_{22})^2]^{1/2}\} \quad (16.14)$$

где знак «+» соответствует λ_1 , а знак «-» относится к λ_2 . Таким образом, исходным уравнениям скорости удовлетворяют решения (16.9) с $\lambda = \lambda_1$ или $\lambda = \lambda_2$. Общее решение представляет собой сумму двух частных решений:

$$\Delta(X_1) = A_{11} e^{-\lambda_1 t} + A_{12} e^{-\lambda_2 t} \quad (16.15a)$$

$$\Delta(X_2) = A_{21} e^{-\lambda_1 t} + A_{22} e^{-\lambda_2 t} \quad (16.15b)$$

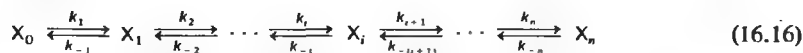
где A_{ij} — параметры, определяемые начальными условиями.

Согласно уравнениям (16.15), увеличение или уменьшение $\Delta(X_1)$ и $\Delta(X_2)$ до конечных равновесных значений является двухстадийным процессом, и параметры λ_1 и λ_2 характеризуют эти две стадии, которые, однако, не соответствуют элементарным стадиям в схеме (16.6). Анализ уравнения (16.14) показывает, что каждый из параметров λ_1 и λ_2 представляет собой совокупность констант скорости двух индивидуальных стадий. Фактически λ_1 и λ_2 соответствуют временным константам, связанным с «нормальными» концент-

рациональными переменными, которые аналогичны «нормальным» координатам, используемым в классической механике.

РЯД ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Рассмотрим более общую схему, содержащую ряд последовательных мономолекулярных реакций:



Уравнения скорости для этой схемы имеют вид

$$\begin{aligned} -d(X_0)/dt &= k_1(X_0) - k_{-1}(X_1) \\ \vdots & \\ -d(X_i)/dt &= -k_i(X_{i-1}) + (k_{-i} + k_{i+1})(X_i) - k_{-(i+1)}(X_{i+1}) \\ \vdots & \\ -d(X_n)/dt &= -k_n(X_{n-1}) + k_{-n}(X_n) \end{aligned} \quad (16.17)$$

Хотя имеется $n + 1$ уравнений, содержащих $n + 1$ концентрационных переменных, одну из них можно исключить, используя уравнение материального баланса:

$$(X)_0 = \sum_{i=0}^n (X_i) \quad (16.18)$$

Таким образом, имеется только n независимых уравнений скорости, поскольку любое из выражений (16.17) можно представить в виде линейной комбинации других. Исключим (X_0) и определим $\Delta(X_i) = (X_i) - (\bar{X}_i)$. Уравнения (16.17) тогда можно записать в виде

$$-d\Delta(X_i)/dt = \sum_{j=1}^n a_{ij}\Delta(X_j) \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n \quad (16.19)$$

где a_{ij} — параметры, содержащие константы скорости. Решение системы линейных дифференциальных уравнений первого порядка имеет следующий вид:

$$\Delta(X_i) = \sum_{j=1}^n A_{ij} e^{-\lambda_j t} \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n \quad (16.20)$$

где A_{ij} — множители, которые зависят от начальных условий, и λ_j — параметры, являющиеся функцией констант скорости [они могут быть получены с использованием характеристического уравнения порядка n , аналогичного уравнению (16.12)]. Таким образом, для механизма с n последовательными стадиями концентрация любой из данных форм представляет собой сумму n экспоненциальных членов. Кроме того, параметры A_{ij} и λ_j даются вполне определенными соотношениями. Если известны константы равновесия для всех стадий механизма и экспериментально определены все λ_j , можно рассчитать все $2n$ констант скорости.

На основании изложенного видно, что мономолекулярные реакции можно анализировать, используя стандартные методы решения систем линейных дифференциальных уравнений. Это справедливо независимо от сложности схемы и числа кинетических форм. В то же время анализ кинетики реакций более высокого порядка связан со значительными трудностями, которые преодолеть не легко даже в случае относительно простых схем.

16.3. Простые бимолекулярные реакции

Даже в случае простой бимолекулярной реакции решение уравнения скорости имеет сложный вид. Бимолекулярную реакцию между ферментом E и субстратом можно представить следующей схемой:



Уравнение скорости для этой схемы имеет вид

$$-d(S)/dt = k_1(E)(S) - k_{-1}(X) \quad (16.22)$$

Уравнения материального баланса можно записать следующим образом:

$$(E)_0 = (E) + (X) \quad (16.23a)$$

$$(S)_0 = (S) + (X) \quad (16.23b)$$

где $(E)_0$ и $(S)_0$ — общая концентрация фермента и субстрата соответственно. Хотя это простая одностадийная реакция, уравнение скорости не имеет удобного аналитического решения, которое было бы справедливо для любых граничных условий. В частном случае, когда $(E)_0 = (S)_0$ и $(X) = 0$ при $t = 0$, решение этого уравнения имеет следующий вид:

$$\ln \left(\frac{2(S) + (k_{-1}/k_1)(1 + \alpha)}{2(S) + (k_{-1}/k_1)(1 - \alpha)} \right) = k_{-1}\alpha t + C \quad (16.24)$$

где $\alpha = [1 + 4(S)_0 k_1/k_{-1}]^{1/2}$ и C — константа. Таким образом, даже при введенных ограничениях решение уравнения скорости для простой бимолекулярной реакции является сложным и громоздким. Поэтому неудивительно, что при анализе даже самых простых механизмов ферментативных реакций имеются значительные трудности. Часто поэтому эксперименты проводятся в условиях, когда можно было бы использовать решения уравнений скорости для стационарного режима протекания реакции или для условий, близких к равновесным.

16.4. Простой механизм Михаэлиса—Ментен

РЕШЕНИЕ УРАВНЕНИЯ СКОРОСТИ ДЛЯ ЧАСТНОГО СЛУЧАЯ

Простейший механизм Михаэлиса—Ментен для ферментативной реакции можно представить следующей схемой:



где P — продукт реакции. Хотя уравнение скорости для этой схемы не имеет удобного аналитического решения в общем виде, Миллер и Алберти (Miller, Alberty, 1958) показали, что такое решение может быть получено при условии $k_1 = k_{-2}$. Для этого частного случая в предположении, что $(S) = (S)_0$ и $(P) = 0$ при $t = 0$, имеем

$$(X) = \frac{2k_1(E)_0(S)_0(1 - e^{-\lambda_1 t})}{(\lambda_1 - \lambda_2) + (\lambda_1 + \lambda_2)e^{-\lambda_1 t}} \quad (16.26a)$$

$$(P) = \frac{2k_2(S)_0[\lambda_1(1 - e^{-\lambda_1 t}) - \lambda_3(1 - e^{-\lambda_2 t})]}{(k_{-1} + k_2)[(\lambda_1 - \lambda_2) + (\lambda_1 + \lambda_2)e^{-\lambda_1 t}]} \quad (16.26b)$$

где

$$\dot{\lambda}_1 = \{k_1[(E)_0 + (S)_0] + k_{-1} + k_2\}^2 - 4k_1^2(E)_0(S)_0\}^{1/2} \quad (16.27a)$$

$$\dot{\lambda}_2 = -\{k_1[(E)_0 + (S)_0] + k_{-1} + k_2\} \quad (16.27б)$$

$$\dot{\lambda}_3 = k_1(E)_0[2k_1(S)_0 + \dot{\lambda}_2 - \dot{\lambda}_1]/(\dot{\lambda}_2 - \dot{\lambda}_1) \quad (16.27в)$$

Хотя это решение является неудобным для анализа экспериментальных данных, оно полезно для понимания кинетического поведения реакции, описываемой этим механизмом.

На рис. 16.1 представлены графики зависимости $(X)/(E)_0$ и $(P)/(\bar{P})$ от времени при $(E)_0 = (S)_0 = 10^{-6}$ М и при $(E)_0 = 10^{-6}$ М и $(S)_0 = 10^{-4}$ М, где $(\bar{P})$ — конечная равновесная концентрация P . Для построения этих кривых использованы одни и те же значения констант скорости (см. подпись к рисунку). Ясно, что при $(E)_0 \ll (S)_0$ концентрация X быстро увеличивается и достигает плато задолго до того, как значительная доля S превратится в P . В этом случае условие $d(X)/dt \approx 0$ выполняется в течение большей части времени превращения S в P . Вместе с тем, когда используемые концентрации субстрата и фермента близки, реакция быстро протекает до конца и в ее ранней фазе одновременно увеличиваются как (X) , так и (P) .

УСЛОВИЯ ПРИМЕНИМОСТИ ПРИНЦИПА СТАЦИОНАРНОСТИ

Когда $k_1 \neq k_{-2}$, нельзя получить решение уравнения скорости для схемы (16.25) в удобной аналитической форме. Поэтому при решении уравнения скорости обычно используется допущение о стационарном режиме протекания реакции (принцип стационарности). Предполагается, что в течение реакции $d(X)/dt \approx 0$. При таком допущении уравнения скорости значительно упрощаются и их решения можно получить в удобной форме. (Мы покажем это в следующем разделе, где более подробно обсуждаются уравнения стационарной скорости.)

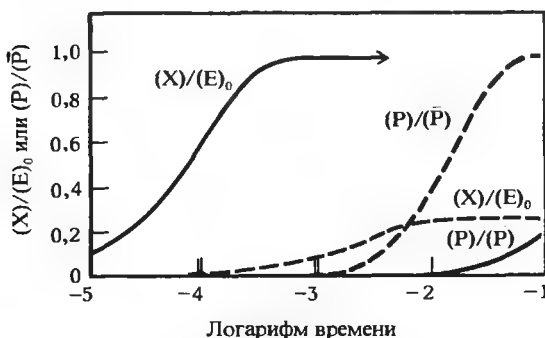


РИС. 16.1. Приближение к равновесию форм, участвующих в реакции с одной промежуточной формой фермента, описываемой уравнением Михаэлиса — Ментен. Штриховые линии относятся к случаю $(E)_0 = (S)_0 = 1 \text{ мкМ}$, сплошные линии — к случаю $(E)_0 = 1 \text{ мкМ}$ и $(S)_0 = 100 \text{ мкМ}$. Кривые получены при следующих значениях параметров: $k_1 = k_{-2} = 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $k_{-1} = k_2 = 10^2 \text{ с}^{-1}$ (Hammes, Schimmel, 1970).

Поскольку допущение о стационарности применяется довольно часто, интересно проанализировать, при каких условиях $d(X)/dt \cong 0$. На основании рис. 16.1 можно предположить, что при $(E)_0 \ll (S)_0$ концентрация X остается постоянной в течение большей части времени образования P . Вернемся к частному случаю, когда $k_1 = k_{-2}$ и $(E)_0 \ll (S)_0$. В этом случае уравнение (16.26а) принимает следующий вид:

$$(X) = [k_1(E)_0(S)_0/\lambda_1](1 - e^{-\lambda_1 t}) \quad (16.28)$$

где

$$\lambda_1 = k_1(S)_0 + k_{-1} + k_2 \quad (16.29)$$

При $(S)_0 = 10^{-4} \text{ М}$, $k_1 = 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $k_{-1} = k_2 = 10^2 \text{ с}^{-1}$ получаем, что $\lambda_1 = 10^4 \text{ с}^{-1}$. Ясно, что при $t \gg 1/\lambda_1$ (например, в данном случае $t \geq 10^{-3} \text{ с}$)

$$(X) = k_1(E)_0(S)_0/\lambda_1 = (E)_0/[1 + K_S/(S)_0] \quad (16.30)$$

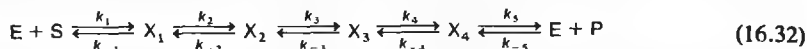
где K_S — константа Михаэлиса для прямой реакции, равная

$$K_S = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (16.31)$$

Итак, в рассматриваемом примере (X) достигает стационарного значения в течение 10^{-3} с . Допущение о стационарности справедливо после этой переходной фазы реакции. [В дальнейшем мы покажем, что выражение (16.30) можно получить и непосредственно из уравнений стационарной скорости, не прибегая к помощи более сложных уравнений, таких, как уравнения (16.26) и (16.27).] На основании вышеизложенного мы приходим к выводу, что *стационарные условия достигаются при $(E)_0 \ll (S)_0$* . (Хотя в качестве примера рассматривался случай, когда $k_1 = k_{-2}$, этот вывод справедлив для многих встречающихся на практике ситуаций.) При изучении стационарной кинетики применяются, как правило, каталитические количества фермента, поэтому при анализе данных можно использовать допущение о стационарном режиме протекания реакции.

16.5. Многочисленные промежуточные формы фермента

Полезно кратко рассмотреть поведение ферментной системы, описывающейся механизмом с участием нескольких промежуточных форм фермента. Такой механизм можно представить следующей схемой:



Интересно выяснить, что происходит с каждой из промежуточных форм фермента, а также, будет ли условие $(E)_0 \ll (S)_0$ обеспечивать стационарность концентрации каждой из X_i после непродолжительной начальной фазы реакции.

Чтобы представить себе поведение промежуточных форм в схеме (16.32), мы должны найти с помощью ЭВМ численное решение уравнения скорости. На рис. 16.2 представлены результаты, полученные на аналоговой ЭВМ для схемы (16.32). Решение получено для условия $k_{-i} = 0$ для всех i , т.е. реакция является необратимой. Значения других параметров приведены в подписи к рисунку. Предполагается, что $(E)_0 = 0,1(S)_0$. Видно, что концентрации X_1 , X_2 и X_3 быстро проходят через промежуточный максимум и затем уменьшаются до практически постоянных уровней за время, несколько превышающее 1 с. Вместе с тем концентрация X_4 монотонно увеличивается до стационарной, которая также достигается в течение 1 с. (Хотя это не показано, концентрация каждой X_i через достаточно

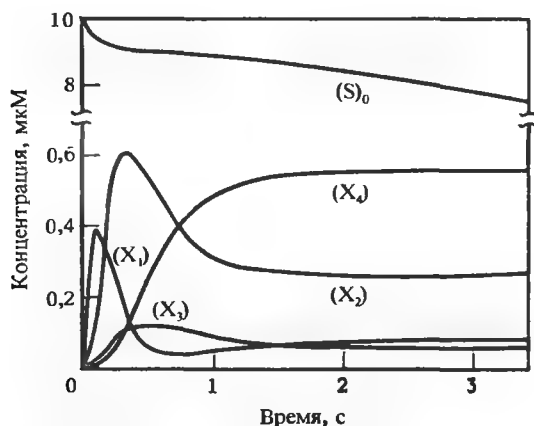


РИС. 16.2. Решение (полученное на аналоговой ЭВМ) уравнений скорости для механизма Михаэлиса — Ментен с участием четырех промежуточных форм фермента при $(E)_0 = 1$ мкМ, $(S)_0 = 10$ мкМ, $k_1 = 0,9 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, $k_2 = 9 \text{ с}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ с}^{-1}$, $k_4 = 9 \text{ с}^{-1}$, $k_5 = 2 \text{ с}^{-1}$ и $k_{-1} = 0$ для $i = 1, 2, \dots, 5$. (Данные любезно предоставил д-р Higgins).

большой промежуток времени уменьшается до нуля, так как все $k_{-i} = 0$.) Только очень незначительная доля S расходуется в течение времени установления стационарных уровней промежуточных форм фермента. Поэтому после короткого периода времени условие стационарности выполняется для всех промежуточных форм. Следовательно, после этого переходного периода справедливо предположение $d(X_i)/dt = 0$ (для всех i) и его можно использовать при выводе уравнения стационарной скорости для такого механизма. И вообще независимо от числа промежуточных форм фермента для каждой из них можно использовать допущение о стационарности, если $(E)_0 \ll (S)_0$.

16.6. Стационарная кинетика

В этом разделе мы обсудим более подробно стационарную кинетику ферментативных реакций. Во всех случаях предполагается, что $(E)_0 \ll (S)_0$, и уравнения скорости применимы только после того, как реакция пройдет через короткую переходную фазу.

Стационарная кинетика ферментативных реакций является обширной и хорошо изученной областью. Здесь мы остановимся на рассмотрении только некоторых основных характеристик кинетических систем. Более подробно эти вопросы изложены в литературе, приведенной в конце главы.

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ С ОДНИМ СУБСТРАТОМ, ОДНИМ ПРОДУКТОМ И ОДНОЙ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ФОРМОЙ ФЕРМЕНТА

Простейшим механизмом ферментативной реакции является кинетическая схема, согласно которой один субстрат превращается в один продукт, и в ходе реакции образуется единственная промежуточная форма фермента:



Два уравнения, описывающие этот механизм, имеют вид

$$-d(S)/dt = k_1(E)(S) - k_{-1}(X) \quad (16.34a)$$

$$-d(X)/dt = -k_1(E)(S) + (k_{-1} + k_2)(X) - k_{-2}(E)(P) \quad (16.34b)$$

В стационарном состоянии $d(X)/dt \equiv 0$. Если вначале реакционная смесь содержит только E и S, то в течение относительно короткого промежутка времени $(P) \equiv 0$ и $(S) = (S)_0$. При таких допущениях уравнение (16.34b) принимает вид

$$(X) = k_1(E)(S)_0 / (k_{-1} + k_2) \quad (16.35)$$

Используя уравнение материального баланса по ферменту и уравнение (16.35), получаем

$$\begin{aligned} (E)_0 &= (E) + (X) \\ &= (E)[1 + k_1(S)_0 / (k_{-1} + k_2)] \\ &= (X)[1 + (k_{-1} + k_2) / k_1(S)_0] \end{aligned} \quad (16.36)$$

Подставляя эти уравнения в уравнение (16.34a), получаем выражение для начальной скорости реакции $v_i = [-d(S)/dt]_{t=0}$:

$$v_i = V_S / [1 + K_S / (S)_0] \quad (16.37)$$

где $V_S = k_2(E)_0$ и $K_S = (k_{-1} + k_2) / k_1$.

Параметр V_S представляет собой максимальную скорость реакции; видно, что $v_i \rightarrow V_S$, когда $(S)_0 \rightarrow \infty$. Заметим, что при $(S)_0 = K_S$ $v_i = V_S/2$, т.е. K_S представляет собой концентрацию субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Из уравнения (16.35) видно, что $(S)_0 = K_S$ соответствует также «полунасыщению» фермента субстратом; из уравнения (16.36)

$$(X)/(E)_0 = [1 + K_S / (S)_0]^{-1}$$

и эта величина равна 1/2, когда $(S)_0 = K_S$.

Дополнение 16.1

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Число оборотов иногда обозначают k_{cat} . Уравнение (16.37) можно записать в виде

$$v_i = V_S(S)_0 / [(S)_0 + K_S]$$

Когда $(S)_0 \ll K_S$, имеем

$$v_i = V_S(S)_0 / K_S$$

Так как $k_{cat} = V_S / (E)_0$, это соотношение можно записать в следующем виде:

$$v_i = (k_{cat} / K_S)(E)_0(S)_0$$

Отношение k_{cat} / K_S , имеющее размерность константы скорости второго порядка ($M^{-1}s^{-1}$), является полезным параметром. Оно представляет собой меру каталитической эффективности и объединяет как максимальную скорость, так и константу Михаэлиса.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАЦИОНАРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

График зависимости v_i от $(S)_0$ представляет собой гиперболу (рис. 16.3) с $v_i \cong (V_S/K_S)(S)_0$ при низких значениях $(S)_0$ (кинетика реакции первого порядка) и $v_i \cong V_S$ при высоких значениях $(S)_0$ (кинетика реакции нулевого порядка). Параметры K_S и V_S обычно находят, преобразуя уравнение (16.37). Наиболее распространенными являются две формы уравнения:

$$1/v_i = (K_S/V_S)[1/(S)_0] + 1/V_S \quad (16.38)$$

$$v_i/(S)_0 = -v_i/K_S + V_S/K_S \quad (16.39)$$

При использовании уравнения (16.38) строится график зависимости $1/v_i$ от $1/(S)_0$ (рис. 16.4, А). Наклон этого линейного графика, называемого графиком Лайнуивера — Берка, дает величину K_S/V_S , а отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $1/V_S$. При использовании уравнения (16.39) строится график зависимости $v_i/(S)_0$ от v_i (рис. 16.4, Б). Наклон этого линейного графика, называемого графиком Иди — Хофсти, дает величину $-1/K_S$; он пересекает ось ординат в точке, равной V_S/K_S . Так как эти два метода графического представления данных дают два способа определения параметров K_S и V_S , целесообразно использовать оба метода, а затем сравнивать полученные результаты.

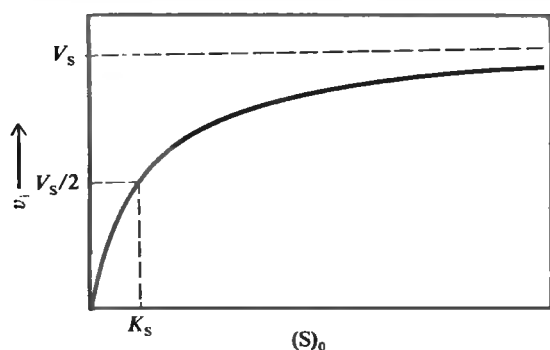


РИС. 16.3. График зависимости v_i от $(S)_0$.

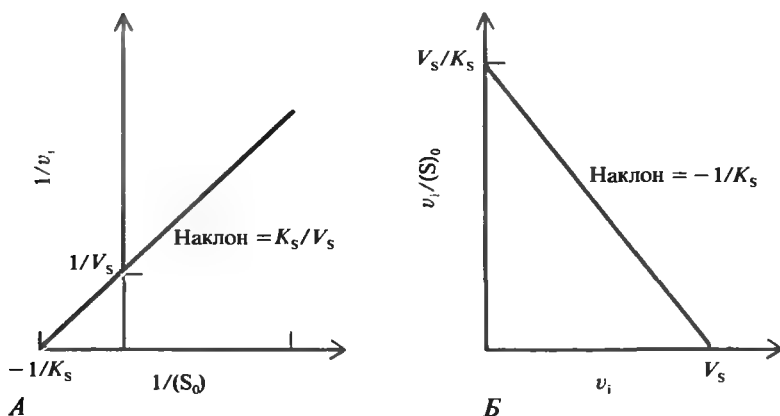


РИС. 16.4. А. График Лайнуивера — Берка. Б. График Иди — Хофсти.

БОЛЕЕ ОБЩЕЕ РЕШЕНИЕ: СООТНОШЕНИЕ ХОЛДЕЙНА

Если допущение $(P) \approx 0$ снять, то решение уравнения (16.34) для стационарных условий имеет следующий вид:

$$v = \frac{(V_S/K_S)(S) - (V_P/K_P)(P)}{1 + (S)/K_S + (P)/K_P} \quad (16.40)$$

где v — стационарная скорость, $V_p = k_{-1}(E_0)$ и $K_p = (k_{-1} + k_2)/k_{-2}$. Таким образом, V_p — максимальная скорость обратной реакции и K_p — константа Михаэлиса для обратной реакции. Заметим, что при $(P) = 0$ уравнение (16.40) упрощается до уравнения (16.37); отметим также, что при $(S) = 0$ для обратной реакции получается уравнение, аналогичное уравнению (16.37).

Параметры V_S , K_S , V_p и K_p обычно находят, измеряя отдельно скорость прямой и обратной реакции. Эти четыре параметра связаны между собой через константу равновесия общей реакции. При равновесии $v = 0$; из уравнения (16.40) следует, что $(V_S/K_S)(\bar{S}) - (V_p/K_p)(\bar{P}) = 0$, где черта над символом обозначает равновесные концентрации. Вводя константу равновесия K_{eq} , получаем соотношение Холдейна:

$$K_{eq} = (\bar{P})/(\bar{S}) = (V_S/K_S)(K_P/V_p) \quad (16.41)$$

Одной из наиболее ценных особенностей соотношения Холдейна является то, что если K_{eq} известна, то оно дает способ проверки внутренней согласованности четырех экспериментально определенных стационарных параметров.

СВЯЗЬ МЕЖДУ КОНСТАНТАМИ МИХАЭЛИСА И КОНСТАНТАМИ РАВНОВЕСИЯ

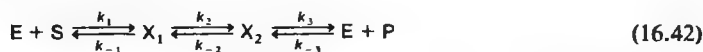
Иногда в неявном виде предполагается, что константы Михаэлиса K_S и K_P эквивалентны константам равновесия. Однако это справедливо только при определенных условиях. По определению $K_S = (k_{-1} + k_2)/k_1$. Если $k_1 \ll k_{-1}$, то $K_S = k_{-1}/k_1$, и, поскольку $k_1(\bar{E})(\bar{S}) = k_{-1}(\bar{X})$, мы имеем $K_S = (\bar{E})(\bar{S})/(\bar{X})$. Таким образом, K_S является константой равновесия диссоциации, когда скорость диссоциации X на $E + S$ значительно превышает скорость его превращения в $E + P$. (В этом случае реакция $E + S \rightleftharpoons X$ всегда находится в равновесии, несмотря на то что общая реакция протекает и X превращается в P .) Однако в случае механизма с участием одной промежуточной формы фермента K_p не может быть константой равновесия, если $k_2 \ll k_{-1}$ (при этом $K_p = k_{-1}/k_{-2}$). Вместе с тем, как мы увидим в дальнейшем, возможны ситуации, когда обе константы Михаэлиса представляют собой константы равновесия. Это наблюдается для механизмов, включающих образование более одной промежуточной формы фермента.

УРАВНЕНИЕ СТАЦИОНАРНОЙ СКОРОСТИ В СЛУЧАЕ МЕХАНИЗМА С НЕСКОЛЬКИМИ ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФОРМАМИ ФЕРМЕНТА

Механизм с участием одной промежуточной формы фермента, представленный схемой (16.33), содержит четыре элементарные константы скорости. Поскольку при исследовании стационарной кинетики определяют четыре стационарных параметра, то из них можно найти каждую из четырех элементарных констант. Однако в действительности механизм с участием только одной промежуточной формы фермента встречается крайне редко, если вообще встречается.

Нетрудно показать, что форма уравнения стационарной скорости [уравнение (16.40)] сохраняется независимо от числа промежуточных форм. Рассмотрим, например, механизм

с участием двух промежуточных форм фермента:



Чтобы получить уравнение стационарной скорости, предположим, что $d(X_1)/dt$ и $d(X_2)/dt$ равны нулю:

$$-d(X_1)/dt = 0 = -k_1(E)(S) + (k_{-1} + k_2)(X_1) - k_{-2}(X_2) \quad (16.43a)$$

$$-d(X_2)/dt = 0 = -k_2(X_1) + (k_{-2} + k_3)(X_2) - k_{-3}(E)(P) \quad (16.43b)$$

Используем также уравнение материального баланса:

$$(E)_0 = (E) + (X_1) + (X_2) \quad (16.44)$$

Решение идентично по форме уравнению (16.40) при

$$K_S = (k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}) / k_1 (k_2 + k_{-2} + k_3) \quad (16.45a)$$

$$V_S = k_2 k_3 (E)_0 / (k_2 + k_{-2} + k_3) \quad (16.45b)$$

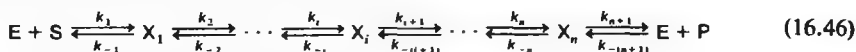
$$K_P = (k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}) / k_{-3} (k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \quad (16.45b)$$

$$V_P = k_{-1} k_{-2} (E)_0 / (k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \quad (16.45г)$$

В этом случае имеется шесть констант скорости, но только четыре стационарных параметра. Поэтому на основании этих параметров нельзя однозначно найти элементарные константы скорости.

НИЖНИЕ ПРЕДЕЛЫ ДЛЯ КОНСТАНТ СКОРОСТИ

В случае механизмов, включающих образование нескольких промежуточных форм фермента, для нахождения нижних пределов величин элементарных констант скорости могут быть использованы константы Михаэлиса и максимальные скорости. Рассмотрим механизм с участием n промежуточных форм фермента



В этом общем случае уравнение стационарной скорости аналогично по форме уравнению (16.40), но выражения четырех стационарных параметров через элементарные константы скорости по мере увеличения числа n становятся все более сложными.

Однако всегда можно рассчитать нижние пределы значений всех $2(n + 1)$ констант скорости, используя следующие соотношения (Peller, Alberty, 1959):

$$k_1 \geq (V_S + V_P) / K_S(E)_0 \quad (16.47a)$$

$$k_{-(n+1)} \geq (V_S + V_P) / K_P(E)_0 \quad (16.47b)$$

$$k_{i+1} \geq V_S / (E)_0 \quad \text{для } i \neq 0 \quad (16.47b)$$

$$k_{-i} \geq V_P / (E)_0 \quad \text{для } i \neq n + 1 \quad (16.47г)$$

Справедливость этих неравенств легко проверить для случая $n = 2$, используя уравнения (16.45). Кроме того, довольно просто показать, что знак равенства справедлив при $n = 1$.

ЧИСЛО ОБОРОТОВ

Параметры $V_S/(E)_0$ и $V_P/(E)_0$ называют обычно числом оборотов для прямой и обратной реакции соответственно. В табл. 16.1 приведены некоторые типичные величины числа оборотов для ферментативных реакций. Видно, что этот параметр может иметь значения от 10^2с^{-1} до 10^6с^{-1} в случае различных ферментных систем. Согласно уравнениям (16.47в, г), число оборотов определяет нижние пределы констант скорости первого порядка для реакции в прямом и обратном направлении, так как каждая элементарная стадия должна протекать со скоростью не меньшей, чем максимальная скорость общей реакции. И наоборот, величина, обратная числу оборотов, определяет верхний предел времени жизни любой промежуточной формы фермента. Например, если $V_S/(E)_0 = 10^2 \text{с}^{-1}$, то данная промежуточная форма до превращения ее в другую форму в ходе прямой реакции существует не более 10^{-2}с .

Другим полезным параметром является величина k_{cat}/K_S (см. Дополнение 16.1).

Таблица 16.1

ПРИБЛИЗИТЕЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ЧИСЛА
ОБОРОТОВ ДЛЯ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ¹⁾

Фермент	Число оборотов, с^{-1}
Карбонат-дегидратаза	10^6
Ацетилхолинэстераза	10^4
Уреаза	10^4
Фумарат-гидратаза	10^3
Аминотрансферазы	10^3
Химотрипсин	$10^2 - 10^3$
Рибонуклеаза А	$10^2 - 10^4$
Карбоксипептидаза	10^2

¹⁾ Hammes G. G., Principles of Chemical Kinetics, New York, Academic Press, 1978.

ВЛИЯНИЕ pH НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Скорость ферментативных реакций, как правило, сильно зависит от pH. Во многих случаях максимальная активность фермента достигается при единственном значении pH (или в узком интервале значений), тогда как при других значениях pH проявляется значительно меньшая активность. Такое изменение активности обусловлено в свою очередь чувствительностью к pH стационарных параметров.

На рис. 16.5 показаны зависимости V_S и K_S от pH, которые имеют колоколообразную форму. Такой тип зависимости означает, что фермент содержит по крайней мере две ионогенные группы, протонирование или депротонирование которых оказывает влияние на его активность. Например, зависимость V_S от pH показывает, что протонирование одной группы приводит к увеличению активности фермента, но дальнейшее протонирование вызывает ее уменьшение. Наиболее простое изменение в кинетической схеме с одной промежуточной формой фермента, введением которого можно описать наблюдаемые

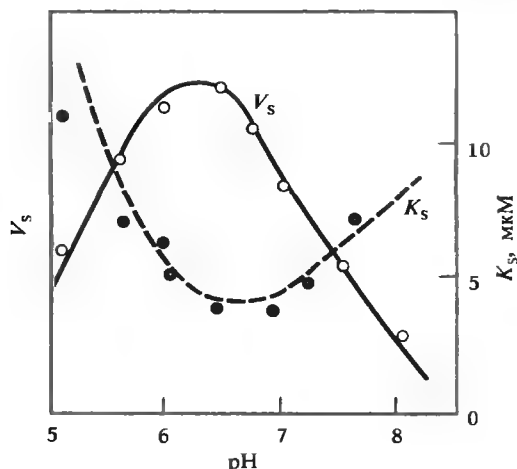
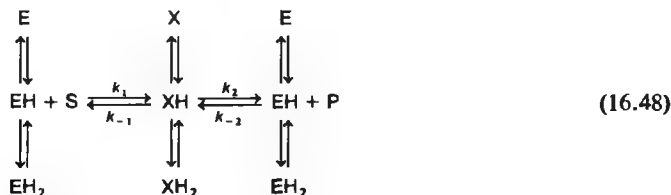


РИС. 16.5. Зависимости стационарных параметров от pH в случае реакции, катализируемой фумаразой. (Frieden, Alberty, J. Biol. Chem., 212, 859, 1955.)

свойства, заключается в следующем:



Согласно этому механизму, молекула фермента содержит две ионогенные группы, влияющие на активность; ионизация других групп не изменяет активность фермента и в схеме (16.48) не рассматривается. Предполагается, что катализ протекает по центральному пути с участием однопротонированных форм фермента. Ясно, что при крайних, как высоких, так и низких значениях pH, активность фермента снижается по мере уменьшения количества однопротонированной формы.

При выводе уравнения стационарной скорости допустим, что равновесие стадий ионизации, расположенных по вертикали, устанавливается быстрее, чем стадий, расположенных по горизонтали. Это допущение вполне разумно, поскольку реакции ионизации являются, как правило, диффузионно-контролируемыми и протекают значительно быстрее других элементарных стадий ферментативной реакции. Поэтому при выводе уравнения стационарной скорости можно использовать следующие выражения для констант диссоциации, характеризующих каждое из ионизационных равновесий:

$$K_{aE} = (EH)(H^+)/ (EH_2) \quad (16.49a)$$

$$K_{bE} = (E)(H^+)/ (EH) \quad (16.49б)$$

$$K_{aX} = (XH)(H^+)/ (XH_2) \quad (16.49в)$$

$$K_{bX} = (X)(H^+)/ (XH) \quad (16.49г)$$

Вывод уравнения стационарной скорости начнем с записи выражения для начальной скорости

$$v_i = -d(S)/dt = d(P)/dt = k_2(XH) \quad (16.50)$$

где предполагается, что в начальный момент времени $(P) \equiv 0$. На основании принципа стационарности имеем

$$d[(X) + (XH) + (XH_2)]/dt = k_1(EH)(S) - (k_{-1} + k_2)(XH) = 0 \quad (16.51)$$

Заметим, что в левой части уравнения (16.51) три промежуточные формы фермента рассматриваются как одно целое; это прямое следствие предположения о том, что равновесие между тремя формами устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью реакции по горизонтальному пути. Однако в правой части уравнения (16.51) учитывается каждая из форм по отдельности, поскольку константы скорости элементарных стадий горизонтального пути реакции на схеме (16.48) относятся только к однопротонированным формам фермента.

Из уравнения (16.51) получаем

$$(XH) = [k_1/(k_{-1} + k_2)](EH)(S)_0 = (EH)(S)_0/K_S \quad (16.52)$$

где, как и прежде, $K_S = (k_{-1} + k_2)/k_1$. Уравнение материального баланса по ферменту имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} (E)_0 &= (E) + (EH) + (EH_2) + (X) + (XH) + (XH_2) \\ &= (EH)[1 + (E)/(EH) + (EH_2)/(EH)] + (XH)[1 + (X)/(XH) + (XH_2)/(XH)] \end{aligned} \quad (16.53)$$

и, комбинируя выражения (16.49) и (16.52), получаем

$$\begin{aligned} (E)_0 &= (EH)[1 + K_{bE}/(H^+) + (H^+)/K_{aE}] + (XH)[1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}] \\ &= (XH)\{[K_S/(S)_0][1 + K_{bE}/(H^+) + (H^+)/K_{aE}] + 1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}\} \end{aligned} \quad (16.54)$$

Подстановка уравнения (16.54) в (16.50) приводит к следующему выражению:

$$v_i = k_2(E)_0/\{[K_S/(S)_0][1 + K_{bE}/(H^+) + (H^+)/K_{aE}] + 1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}\} \quad (16.55)$$

По определению v_i стремится к максимальной скорости V'_S , когда $(S)_0 \rightarrow \infty$. Учитывая это, из уравнения (16.55) получаем

$$V'_S = V_S/[1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}] \quad (16.56)$$

где $V_S = k_2(E)_0$ — максимальная скорость, полученная ранее для простого механизма с участием одной промежуточной формы фермента, в котором отсутствуют ионизационные равновесия. Используя это выражение для V'_S , можно записать уравнение (16.55) в следующем виде:

$$v_i = V'_S/[1 + K'_S/(S)_0] \quad (16.57)$$

где

$$K'_S = K_S \left(\frac{1 + K_{bE}/(H^+) + (H^+)/K_{aE}}{1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}} \right) \quad (16.58)$$

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ pH-ЗАВИСИМОСТЕЙ

Уравнение (16.57) идентично по форме выражению (16.37). Однако в этом уравнении параметры K'_S и V'_S зависят от pH. Можно показать, что график pH-зависимости V'_S имеет колоколообразную форму. Фактически в условиях насыщения фермента субстратом зависимость V'_S от pH отражает зависимость от pH концентрации формы ХН. Это видно из уравнения (16.54) при $(S) \rightarrow \infty$:

$$(XH) = (E)_0 / [1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}] \quad (16.59)$$

Знаменатель в уравнении (16.59) идентичен знаменателю в уравнении (16.56).

Выражения, аналогичные (16.59), можно получить для (X) и (XH_2) и использовать вместе с уравнениями (16.59) для схематического изображения зависимостей от pH концентраций трех промежуточных форм фермента. На рис. 16.6 приведены примеры таких зависимостей для случаев, когда $pK_{aX} = 5$ и $pK_{bX} = 10$ или $pK_{aX} = 7$ и $pK_{bX} = 8$. Видно, что высота и ширина колоколообразных кривых зависимости (XH) от pH (или V'_S от pH) чувствительны к разности между двумя величинами pK .

Выражение для K'_S [уравнение (16.58)] содержит отношение двух функций, каждая из которых представляет собой колоколообразную зависимость. Поэтому зависимость K'_S от pH не может иметь вид простой перевернутой колоколообразной кривой (подобной изображенной на рис. 16.5). Действительно, при $K_{aX} = K_{aE}$ и $K_{bX} = K_{bE}$ K'_S не зависит от pH, даже если V'_S является pH-зависимым параметром. Поэтому, чтобы наблюдалась зависимость K'_S от pH, один или оба pK промежуточной формы фермента должны отличаться от соответствующих значений для свободного фермента. Такое изменение величин pK может вызываться связыванием субстрата.

Ранее мы показали, что в случае механизма с участием одной промежуточной формы фермента, в котором отсутствуют ионизационные равновесия [уравнение (16.33)], K_S представляет собой константу диссоциации для стадии $E + S \rightleftharpoons X$, если $k_2 \ll k_{-1}$. Если мы снова предположим, что $k_2 \ll k_{-1}$, то уравнение (16.58) примет следующий вид:

$$\begin{aligned} K'_S &= \frac{k_{-1}}{k_1} \left(\frac{1 + K_{bE}/(H^+) + (H^+)/K_{aE}}{1 + K_{bX}/(H^+) + (H^+)/K_{aX}} \right) \\ &= \frac{(EH)(S)}{(XH)} \left(\frac{1 + (E)/(EH) + (EH_2)/(EH)}{1 + (X)/(XH) + (XH_2)/(XH)} \right) \\ &= [(E) + (EH) + (EH_2)](S) / [(X) + (XH) + (XH_2)] \end{aligned} \quad (16.60)$$

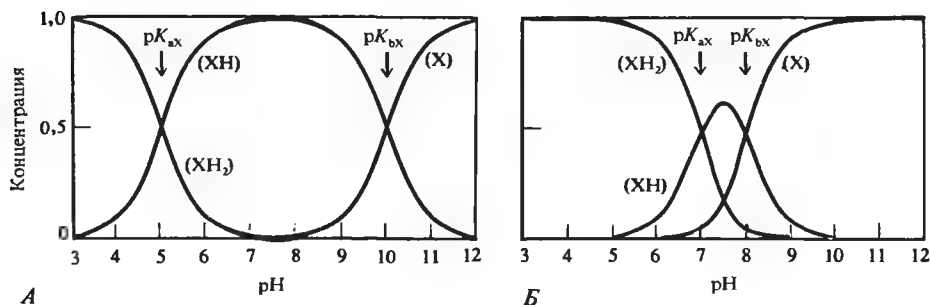


РИС. 16.6. Зависимости концентраций промежуточных форм фермента от pH в случае механизма Михаэлиса—Ментен с участием одной промежуточной формы фермента [уравнение (16.48)]. А. Кривые для $pK_{aX} = 5$ и $pK_{bX} = 10$. Б. Кривые для $pK_{aX} = 7$ и $pK_{bX} = 8$.

Согласно уравнению (16.60), K'_S (как и K_S) можно рассматривать как константу равновесия при $k_2 \ll k_{-1}$. K'_S представляет собой макроскопическую константу диссоциации, которая учитывает все ионизированные формы фермента.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ ИОНИЗАЦИИ

Четыре константы ионизации относительно несложно определяются в случае простого механизма с участием одной промежуточной формы фермента. Константы K_{aX} и K_{bX} могут быть определены из зависимости V'_S от pH. Если при этом pK_{aX} и pK_{bX} значительно различаются по величине, то два значения pK можно найти с достаточной точностью по средней точке двух нисходящих ветвей кривой (pK_{aX} по средней точке кривой в области кислых значений pH и pK_{bX} — в области щелочных значений pH). Если график зависимости V'_S от pH имеет острый максимум, то приблизительные значения двух pK можно определить по средним точкам на каждой из ветвей кривой, нисходящей и восходящей; более точные значения pK_{aX} и pK_{bX} затем можно рассчитать, подбирая каждое из них до тех пор, пока не будет получено наилучшее соответствие между наблюдаемой и расчетной зависимостями V'_S от pH.

Параметр K'_S зависит от всех четырех констант ионизации. Однако из уравнений (16.56) и (16.58) видно, что отношение K'_S/V'_S зависит только от величин pK свободного фермента:

$$K'_S/V'_S = [K_S/k_2(E)_0][1 + K_{bE}/(H^+) + (H^+)/K_{aE}] \quad (16.61)$$

Поэтому зависимость K'_S/V'_S от pH имеет вид простой перевернутой колоколообразной кривой. Значения двух pK (pK_{aE} и pK_{bE}) можно определить так же, как это описано выше для нахождения pK_{aX} и pK_{bX} .

Число значений pK, которые необходимо учитывать, растет по мере увеличения числа промежуточных форм фермента, образующихся в ходе ферментативной реакции. Для механизма с двумя промежуточными формами [уравнение (16.42)] предположение о существовании трех протонированных состояний каждой формы фермента приводит в сумме к шести значениям pK. В этом случае V'_S является функцией четырех pK, относящихся к промежуточным формам фермента, а K'_S зависит от значений всех шести pK. В такой ситуации попытка подогнать экспериментальные pH-зависимости параметров K'_S и V'_S к уравнениям (16.56 и 16.58) для модели с одной промежуточной формой может оказаться безуспешной. Это свидетельствует в пользу того, что следует принимать во внимание дополнительные формы фермента (большее число промежуточных форм).

Обычно пытаются найти простейший механизм (с наименьшим числом стадий ионизации), с помощью которого можно было бы объяснить все экспериментальные данные. Это дает возможность оценить минимальное число групп, ионизация которых влияет на каталитическую активность, а также позволяет найти значения pK этих групп. На основании значений pK можно получить некоторое представление о химической природе ионизированных групп фермента. Например, карбоксильные группы белковой молекулы ионизируются в области значений pH 3,5—5,0; остатки гистидина — при pH 5,5—7,0; остатки цистеина — при pH 7,5—9,0 и т.д. Довольно широкий диапазон значений наблюдаемых pK для каждой группы объясняется разнообразием химического микроокружения, которое может существовать в области любого данного остатка.

В заключение следует отметить, что в тех случаях, когда субстрат существует в двух (или более) ионизированных формах, ионизацию субстрата необходимо учитывать при количественном описании pH-зависимостей стационарных параметров. В этих случаях вывод соответствующих уравнений стационарной скорости аналогичен выводу, описанному ранее для механизма, в котором учитывалась только ионизация групп фермента. Су-

существенное упрощение заключается в том, что значения pK свободного субстрата можно определить непосредственно из данных по титрованию. Определив один раз эти значения, можно их далее использовать в соответствующих выражениях для скорости реакции.

ОГРАНИЧЕНИЯ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

Один метод стационарной кинетики не позволяет исследовать механизм ферментативной реакции достаточно полно. Ограничение связано главным образом с тем, что измерение стационарной скорости превращения субстрата в продукт не дает информации о существовании нескольких промежуточных форм фермента или о времени их жизни. Кроме того, стационарные условия обычно достигаются при $(E)_0 \ll (S)_0$; при этом концентрация различных форм фермента настолько мала, что их не удается зарегистрировать. Положение может быть исправлено постановкой экспериментов в условиях, где концентрации субстрата и фермента близки, или использованием устройств для быстрого смешивания, позволяющих смешивать растворы фермента и субстрата за время $\sim 10^{-3}$ с. Однако многие элементарные стадии катализа протекают быстрее, чем в течение 10^{-3} с, и поэтому эти быстрые стадии не удастся зарегистрировать. Кроме того, как мы уже отмечали, в нестационарных условиях при использовании близких концентраций субстрата и фермента уравнения скорости становятся настолько сложными, что для их решения приходится прибегать к специальным и очень трудоемким методам.

16.7. Релаксационная спектроскопия

Другим подходом, с помощью которого были достигнуты большие успехи в исследовании механизма ферментативных реакций, является релаксационная спектроскопия. Этот подход разработан Эйгеном (Eigen, Maeyer, 1963). Принцип релаксационной спектроскопии достаточно прост. В реакционной смеси, находящейся в равновесии, быстро изменяют одну из термодинамических переменных (температуру, давление, напряженность электрического поля), которые влияют на положение равновесия реакции. Это заставляет систему перейти в новое положение равновесия, т.е. реакция релаксирует к новому конечному равновесному состоянию. Кинетика такой релаксации зависит от скорости элементарных стадий ферментативной реакции.

Такой подход имеет два основных преимущества. Поскольку термодинамическую переменную, такую, как температура, можно изменить очень быстро (с помощью метода «температурного скачка» это достигается за 10^{-6} с или быстрее), с помощью релаксационной спектроскопии можно исследовать любую реакцию, величины параметра скорости которой больше, чем время, необходимое для термодинамического возмущения. Ясно, что такой подход значительно расширяет доступный для исследования временной интервал по сравнению с тем, который можно достигнуть с использованием методов быстрого смешивания.

Второе преимущество связано с тем, что, поскольку обычно используется достаточно малое термодинамическое возмущение, реакция незначительно смещается от положения равновесия. В этом случае уравнения скорости, описывающие релаксацию к равновесию, можно привести к линейной форме, т.е. независимо от сложности механизма получить систему кинетических уравнений первого порядка. Благодаря такому упрощению практически для любой встречающейся ситуации можно получить относительно простые решения уравнений скорости.

На практике обычно используются релаксационные методы двух типов: метод «скачка», когда термодинамическая переменная изменяется резко (ступенчато) до нового значения, и стационарные методы, когда термодинамический параметр изменяется непрерывно.



РИС. 16.7. Временная шкала различных методов изучения быстрых реакций (Hammes, Schimmel, 1970).

но (волнообразно). Методы температурного скачка и скачка давления являются примерами резкого изменения, а использование ультразвука — примером стационарного изменения термодинамической переменной. На рис. 16.7 показаны временные интервалы, в которых можно изучать кинетику процессов, применяя различные релаксационные и некоторые другие методы. (Всегда существует как верхний, так и нижний предел по времени. Например, в случае метода температурного скачка нижний предел определяется скоростью, с которой производится скачок температуры, а верхний предел определяется скоростью охлаждения и конвекционными эффектами, возникающими после получения раствора теплового импульса.) Ясно, что эти методы охватывают широкий диапазон времен.

В последующем обсуждении мы будем считать, что применяется ступенчатое возмущение, например температурный скачок. Этот релаксационный метод используется при изучении биохимических систем чаще других. Однако рассматриваемые принципы анализа справедливы не только для температурного скачка, но и для других способов возмущения.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЛАКСАЦИИ

В общем случае равновесные концентрации форм, участвующих в реакции, зависят от термодинамических переменных, например температуры. Рассмотрим в качестве примера следующую реакцию:



для которой константа равновесия K равна

$$K = \frac{\overline{E}\overline{S}}{\overline{X}} = e^{-\Delta H^0/RT} e^{\Delta S^0/R} \quad (16.63)$$

а ΔH^0 и ΔS^0 — изменение стандартной энтальпии и энтропии реакции. Нас интересует, как равновесные концентрации различных форм изменяются с температурой. Дифференцируя выражение для $\ln K$, получаем

$$d(\ln K) = \overline{E}^{-1} d\overline{E} + \overline{S}^{-1} d\overline{S} - \overline{X}^{-1} d\overline{X} \quad (16.64)$$

Так как на основании уравнения материального баланса $d(\bar{X}) = -d(\bar{E}) = -d(\bar{S})$, уравнение (16.64) принимает следующий вид:

$$d(\ln K) = [(\bar{E})^{-1} + (\bar{S})^{-1} + (\bar{X})^{-1}] d(\bar{E}) \quad (16.65)$$

Кроме того, из уравнения Вант-Гоффа известно, что при постоянном давлении

$$d(\ln K) = (\Delta H^0/RT^2) dT \quad (16.66)$$

Подставляя уравнение (16.66) в уравнение (16.65), получаем

$$\begin{aligned} d(\bar{E}) &= \{1/[(\bar{E})^{-1} + (\bar{S})^{-1} + (\bar{X})^{-1}]\} (\Delta H^0/RT^2) dT \\ &= \Gamma (\Delta H^0/RT^2) dT \end{aligned} \quad (16.67)$$

где

$$\Gamma = 1/[(\bar{E})^{-1} + (\bar{S})^{-1} + (\bar{X})^{-1}] \quad (16.68)$$

Для конечного изменения температуры ΔT имеем

$$\Delta(\bar{E}) = \Gamma (\Delta H^0/RT^2) \Delta T \quad (16.69)$$

Изменение равновесных концентраций других форм определяется из соотношения $\Delta(\bar{E}) = \Delta(\bar{S}) = -\Delta(\bar{X})$.

Уравнение (16.69) показывает, что для данного ΔT величина $\Delta(\bar{E})$ определяется параметрами Γ и ΔH^0 . Ясно, что $\Delta(\bar{E}) \rightarrow 0$ при $\Delta H^0 \rightarrow 0$ или $\Gamma \rightarrow 0$. Однако для многих биохимических процессов $\Delta H^0 \neq 0$. Параметр $\Gamma \rightarrow 0$ при $(\bar{E}) \rightarrow 0$, или при $(\bar{S}) \rightarrow 0$, или при $(\bar{X}) \rightarrow \infty$. Условие $(\bar{E}) \rightarrow 0$ выполняется, когда весь фермент связан; аналогично $(\bar{S}) \rightarrow 0$, когда связан весь субстрат. В этих случаях равновесие сильно сдвинуто вправо при избытке E или S. И наоборот, когда равновесие сильно сдвинуто влево, $(\bar{X}) \rightarrow 0$. Ясно, что оптимальное значение Γ достигается, когда реакция не находится ни в одном из крайних положений. Нетрудно показать, что при $(E)_0 = (S)_0$ Γ имеет максимальное значение около точки полунасыщения реакции.

Принцип релаксационного метода заключается в быстром изменении температуры на величину ΔT ; при предположении, что $\Delta H^0 \neq 0$ и $\Gamma \neq 0$, это быстрое изменение температуры приводит к достижению нового значения $(\bar{E})$. Время, необходимое для достижения этого нового значения, обычно называют «временем релаксации»; оно определяется константами скорости и равновесными концентрациями реагентов.

На рис. 16.8 схематически представлена релаксация системы к новому равновесному состоянию. Исходная равновесная концентрация фермента равна $(\bar{E}_1)$ при $T = T_1$. В момент



РИС. 16.8. Схематическое изображение изменения во времени концентрации фермента после скачкообразного повышения температуры системы.

времени $t = t_0$ температура системы скачкообразно повышается, так что T увеличивается до T_2 . Сдвиг температуры означает, что $(\bar{E})$ должна измениться от $(\bar{E}_1)$ до $(\bar{E}_2)$. Если скорость установления равновесия реакции (16.62) низка по сравнению со скоростью увеличения температуры, то рост $(\bar{E})$ от $(\bar{E}_1)$ происходит монотонно по экспоненциальному закону вслед за повышением температуры.

Измеряя при различных значениях $(\bar{E})$ и $(\bar{S})$ время релаксации, определяемое экспонентой на рис. 16.8, мы, как увидим в дальнейшем, можем получить точные значения констант скорости, характеризующих реакцию.

КИНЕТИКА РЕЛАКСАЦИИ

При небольшом смещении равновесия решение уравнения скорости, описывающего одностадийную бимолекулярную реакцию, имеет очень простой вид. Пусть k_1 — бимолекулярная константа скорости прямой реакции и k_{-1} — константа скорости обратной реакции. Уравнение скорости имеет вид

$$-d(E)/dt = k_1(E)(S) - k_{-1}(X) \quad (16.70)$$

Концентрации реагентов можно представить следующим образом:

$$(E) = (\bar{E}) + \Delta(E) \quad (16.71a)$$

$$(S) = (\bar{S}) + \Delta(S) \quad (16.71b)$$

$$(X) = (\bar{X}) + \Delta(X) \quad (16.71в)$$

где $(\bar{E})$, $(\bar{S})$ и $(\bar{X})$ — конечные равновесные концентрации [на рис. 16.8 $(\bar{E})$ обозначена как $(\bar{E}_2)$], $\Delta(E)$, $\Delta(S)$ и $\Delta(X)$ — отклонения концентраций от равновесных значений. Используя эти выражения, уравнение (16.70) можно записать в виде

$$-d\Delta(E)/dt = k_1[(\bar{E}) + \Delta(E)][(\bar{S}) + \Delta(S)] - k_{-1}[(\bar{X}) + \Delta(X)] \quad (16.72)$$

Уравнение материального баланса требует, чтобы $\Delta(E) = \Delta(S) = -\Delta(X)$; кроме того, по определению равновесного состояния $k_1(\bar{E})(\bar{S}) = k_{-1}(\bar{X})$. Подставляя эти соотношения в уравнение (16.72) и пренебрегая членами, содержащими $\Delta(E)^2$, как очень малыми по сравнению с членами, содержащими $\Delta(E)$, получаем

$$-d\Delta(E)/dt = \Delta(E)/\tau \quad (16.73a)$$

$$\Delta(E) = \Delta(E)^0 e^{-t/\tau} \quad (16.73б)$$

где

$$1/\tau = k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})] + k_{-1} \quad (16.74)$$

и $\Delta(E)^0$ — отклонение (E) от конечного равновесного значения при $t = 0$; на рис. 16.8 $\Delta(E)^0 = (\bar{E}_2) - (\bar{E}_1)$. Параметр τ представляет собой время релаксации; он является функцией констант скорости и равновесных концентраций. Обычно порядок величин параметров в уравнении (16.74) составляет $k_1 = 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, $k_{-1} = 10^4 \text{ с}^{-1}$ и $(\bar{E}) = (\bar{S}) = 10^{-4} \text{ M}$. При этих значениях параметров $\tau = 33 \text{ мкс}$.

Уравнение (16.73) справедливо только в случае небольших возмущений равновесия; отклонение от равновесия должно быть достаточно малым для гарантии того, чтобы любые члены, содержащие $\Delta(E)^2$, были пренебрежимо малы по сравнению с членами, содержащими $\Delta(E)$.

Константы скорости k_1 и k_{-1} можно получить из линейного графика зависимости $1/\tau$

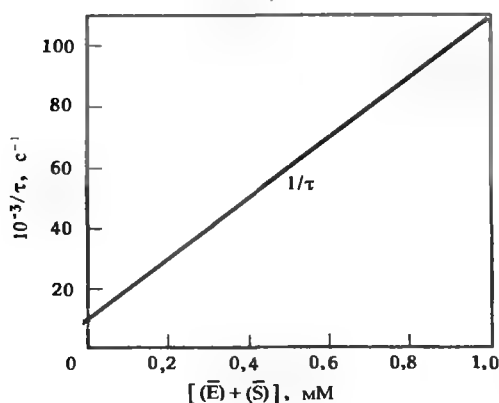


РИС. 16.9. График зависимости $1/\tau$ от $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$, построенный согласно уравнению (16.74) при $k_1 = 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ и $k_{-1} = 10^4 \text{ c}^{-1}$ (Hammes, Schimmel, 1970).

от $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$ (рис. 16.9). Наклон прямой дает k_1 , точка пересечения с осью ординат — k_{-1} .

Чтобы построить график, представленный на рис. 16.9, необходимо рассчитать $(\bar{E})$ и $(\bar{S})$. Для этого, в свою очередь, нужно знать константу равновесия $K = k_{-1}/k_1$. Если K не известна, то для построения графика можно использовать произвольно выбранное значение K . Из графика определяют k_1 и k_{-1} и рассчитывают новое значение K . Его используют для построения следующего графика и т.д., пока используемое значение не будет совпадать с полученным из графика.

ЛИНЕАРИЗОВАННЫЕ УРАВНЕНИЯ СКОРОСТИ ДЛЯ ДВУХСТАДИЙНОГО МЕХАНИЗМА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Во многих случаях после связывания с белком малой молекулы происходит конформационное изменение первоначально образовавшегося комплекса. Такое связывание изображается двухстадийной схемой



Этот реакционный механизм имеет две независимые стадии и поэтому описывается двумя уравнениями скорости. Если в качестве переменных мы выберем (E) и (X_2) , то уравнения скорости будут иметь следующий вид:

$$-d(E)/dt = k_1(E)(S) - k_{-1}(X_1) \quad (16.76a)$$

$$-d(X_2)/dt = -k_2(X_1) + k_{-2}(X_2) \quad (16.76b)$$

По аналогии с одностадийным механизмом, согласно которому $(E) = (\bar{E}) + \Delta(E)$ и т.д., и используя уравнение материального баланса, согласно которому $\Delta(E) = \Delta(S) = -\Delta(X_1) = -\Delta(X_2)$, уравнения (16.76) можно записать в виде

$$-d\Delta(E)/dt = \{k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})] + k_{-1}\} \Delta(E) + k_{-1} \Delta(X_2) \quad (16.77a)$$

$$-d\Delta(X_2)/dt = k_2 \Delta(E) + (k_{-2} + k_2) \Delta(X_2) \quad (16.77b)$$

или

$$-d\Delta(E)/dt = a_{11}\Delta(E) + a_{12}\Delta(X_2) \quad (16.78a)$$

$$-d\Delta(X_2)/dt = a_{21}\Delta(E) + a_{22}\Delta(X_2) \quad (16.78b)$$

где члены a_{ij} в уравнении (16.78) определяются при сравнении с уравнением (16.77). Таким образом, вблизи равновесия уравнения скорости, описывающие двухстадийную реакцию (16.75), являются простыми линейными дифференциальными уравнениями первого порядка.

Решение двух линейных дифференциальных уравнений первого порядка было рассмотрено при анализе последовательных мономолекулярных реакций [схема (16.6)]. Уравнения (16.78) совершенно аналогичны уравнениям (16.8). Поэтому решение уравнений (16.78) представляет собой сумму двух экспонент для каждой концентрационной переменной $\Delta(E)$ и $\Delta(X_2)$:

$$\Delta(E) = A_{11}e^{-t/\tau_1} + A_{12}e^{-t/\tau_2} \quad (16.79a)$$

$$\Delta(X_2) = A_{21}e^{-t/\tau_1} + A_{22}e^{-t/\tau_2} \quad (16.79b)$$

В этом решении есть два времени релаксации, τ_1 и τ_2 . Параметры A_{ij} зависят от ΔH^0 и Γ , которые характеризуют механизм реакции, и от ΔT (например, при использовании метода температурного скачка). Величины, обратные временам релаксации, находят, решая характеристическое уравнение [ср. с уравнением (16.12)]:

$$\begin{vmatrix} a_{11} - 1/\tau & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - 1/\tau \end{vmatrix} = 0 \quad (16.80)$$

или

$$(1/\tau)^2 - (a_{11} + a_{22})(1/\tau) + (a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}) = 0 \quad (16.81)$$

Корни этого квадратного уравнения равны

$$1/\tau_{1,2} = [(a_{11} + a_{22})/2] \{1 \pm [1 - 4(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21})/(a_{11} + a_{22})^2]^{1/2}\} \quad (16.82)$$

где знак «+» соответствует τ_1 , а знак «-» τ_2 .

Два времени релаксации являются функциями равновесных концентраций ($\bar{E}$) и ($\bar{S}$) и четырех констант скорости, характеризующих двухстадийный механизм. Все четыре константы скорости можно определить, изучая концентрационную зависимость каждого из времен релаксации.

УПРОЩЕННОЕ ВЫРАЖЕНИЕ ДЛЯ ВРЕМЕН РЕЛАКСАЦИИ В СЛУЧАЕ ДВУХСТАДИЙНОГО МЕХАНИЗМА

Во многих случаях бимолекулярная стадия в схеме (16.75) протекает гораздо быстрее, чем стадия мономолекулярного конформационного изменения, т.е. $k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})] + k_{-1} \gg k_2 + k_{-2}$. Тогда $a_{11} \gg a_{22}$ и подкоренное выражение в уравнении (16.82) можно упростить:

$$[1 - 4(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21})/(a_{11} + a_{22})^2]^{1/2} \cong 1 - 2(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21})/a_{11}^2 \quad (16.83)$$

[Напомним, что $(1 - x)^{1/2} \cong 1 - x/2$ при $x \ll 1$]. Используя это упрощенное уравнение и выражая параметры a_{ij} через константы скорости и равновесные концентрации [см. урав-

нения (16.77) и (16.78)], приходим к следующим очень простым уравнениям:

$$1/\tau_1 = k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})] + k_{-1} \quad (16.84a)$$

$$1/\tau_2 = k_2/(1 + k_{-1}/\{k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\}) + k_{-2} \quad (16.84b)$$

Заметим, что выражение для $1/\tau_1$ идентично уравнению (16.74), полученному в случае одностадийного реакционного механизма. Если вторая стадия двухстадийного механизма очень медленная по сравнению с первой, то бимолекулярная стадия находится по существу в состоянии равновесия независимо от конформационного изменения, т.е. вторая стадия как бы «заморожена» в течение времени установления равновесия первой стадии. Поэтому выражение для времени релаксации бимолекулярной стадии в схеме (16.75) идентично выражению для времени релаксации в случае простого одностадийного механизма. Уравнение для $1/\tau_2$ содержит все четыре константы скорости, а также равновесные концентрации $\bar{E}$ и $\bar{S}$. Это обусловлено тем, что медленная релаксация второй стадии связана с быстро устанавливающимся равновесием первой.

Из графиков зависимости $1/\tau_1$ и $1/\tau_2$ от $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$ можно найти все четыре константы скорости. Из графика зависимости $1/\tau_1$ от $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$ определяют k_1 и k_{-1} , как показано на рис. 16.9. На рис. 16.10 представлен график $1/\tau_2$ от $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$. В области низких значений $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$ зависимость линейна и наклон прямой дает величину $k_1 k_2 / k_{-1}$. В области высоких значений $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$ $1/\tau_2$ асимптотически приближается к величине, равной $k_2 + k_{-2}$, а точка пересечения графика с осью ординат при $[(\bar{E}) + (\bar{S})] = 0$ соответствует k_{-2} . Таким образом, из концентрационной зависимости $1/\tau_2$ можно относительно легко получить k_2 и k_{-2} .

ДРУГОЙ ВЫВОД УРАВНЕНИЙ ДЛЯ ВРЕМЕН РЕЛАКСАЦИИ В СЛУЧАЕ ДВУХСТАДИЙНОГО МЕХАНИЗМА

Уравнения для двух времен релаксации в случае, когда равновесие на первой стадии устанавливается намного быстрее, чем на второй, можно получить и другим способом. Из предположения, что вторая стадия «заморожена» в течение релаксации первой, прямо следует выражение для τ_1 как времени релаксации одностадийной реакции. Для второй стадии уравнение скорости имеет вид

$$-d\Delta(X_2)/dt = -k_2\Delta(X_1) + k_{-2}\Delta(X_2) \quad (16.85)$$

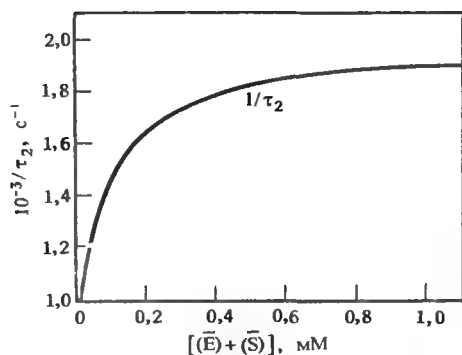


РИС. 16.10. График зависимости $1/\tau_2$ от $[(\bar{E}) + (\bar{S})]$, построенный согласно уравнению (16.84b) при $k_1 = 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, $k_{-1} = 10^4 \text{ c}^{-1}$ и $k_2 = k_{-2} = 10^3 \text{ c}^{-1}$ (Hammes, Schimmel, 1970).

Чтобы решить уравнение (16.85), необходимо $\Delta(X_1)$ выразить через $\Delta(X_2)$. Мы можем это сделать, используя уравнение материального баланса и тот факт, что равновесие на первой стадии все время существует в течение релаксации второй стадии. На основании уравнения материального баланса по ферменту имеем

$$\Delta(E) + \Delta(X_1) + \Delta(X_2) = 0 \quad (16.86a)$$

или

$$\Delta(X_1) = -\Delta(X_2)/[1 + \Delta(E)/\Delta(X_1)] \quad (16.86b)$$

Условие установившегося равновесия на бимолекулярной стадии в ходе релаксации второй стадии означает, что для нахождения $\Delta(E)/\Delta(X_1)$ можно использовать выражение для константы равновесия, на основании которого $k_{-1}/k_1 = (E)(S)/(X_1)$, и, таким образом,

$$(k_{-1}/k_1) \Delta(X_1) = (\bar{E}) \Delta(S) + (\bar{S}) \Delta(E) = [(\bar{E}) + (\bar{S})] \Delta(E) \quad (16.87)$$

Здесь мы использовали равенство $\Delta(E) = \Delta(S)$, которое следует из уравнения материального баланса. Таким образом,

$$\Delta(E)/\Delta(X_1) = k_{-1}/\{k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\} \quad (16.88)$$

Подстановка этого выражения в уравнение (16.86) дает

$$\Delta(X_1) = -\Delta(X_2)/\{1 + k_{-1}/\{k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\}\} \quad (16.89)$$

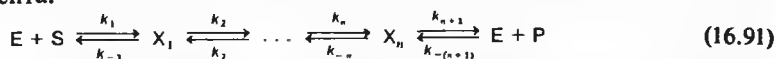
Используя это соотношение и уравнение (16.85), получаем

$$-d\Delta(X_2)/dt = \Delta(X_2)/\tau_2 \quad (16.90)$$

где $1/\tau_2$ дается уравнением (16.84б).

НАБОР ВРЕМЕН РЕЛАКСАЦИИ В СЛУЧАЕ МЕХАНИЗМА С n ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФОРМАМИ ФЕРМЕНТА

Простые подходы, использованные при анализе двухстадийного механизма, часто можно применить при анализе целого ряда других механизмов, в которых одна или несколько стадий являются очень медленными по сравнению с другими стадиями кинетического механизма. Рассмотрим в качестве общего случая механизм с участием n промежуточных форм фермента:



Эта схема имеет $n + 1$ независимых стадий, поэтому она описывается $n + 1$ уравнениями скорости и характеризуется $n + 1$ временами релаксации. Линеаризованные уравнения скорости имеют следующий вид:

$$-d\Delta(X_1)/dt = a_{11} \Delta(X_1) + a_{12} \Delta(X_2) + \dots + a_{1(n+1)} \Delta(E) \quad (16.92a)$$

$$-d\Delta(X_2)/dt = a_{21} \Delta(X_1) + a_{22} \Delta(X_2) + \dots + a_{2(n+1)} \Delta(E) \quad (16.92b)$$

$$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$$

$$-d\Delta(X_n)/dt = a_{n1} \Delta(X_1) + a_{n2} \Delta(X_2) + \dots + a_{n(n+1)} \Delta(E) \quad (16.92в)$$

$$-d\Delta(E)/dt = a_{(n+1)1} \Delta(X_1) + a_{(n+1)2} \Delta(X_2) + \dots + a_{(n+1)(n+1)} \Delta(E) \quad (16.92г)$$

где члены a_{ij} являются функциями $2(n + 1)$ констант скорости и $(\bar{E})$, $(\bar{S})$ и $(\bar{P})$. Решение этих

уравнений имеет вид

$$\Delta(X_i) = \sum_{j=1}^{n+1} A_{ij} e^{-t/\tau_j} \quad \text{for } i = 1, 2, \dots, n \quad (16.93a)$$

$$\Delta(E) = \sum_{j=1}^{n+1} A_{(n+1)j} e^{-t/\tau_j} \quad (16.93b)$$

где члены A_{ij} — постоянные, параметры τ_j — времена релаксации. Значения τ_j можно найти путем решения характеристического уравнения

$$\begin{vmatrix} a_{11} - 1/\tau & a_{12} & \cdots & a_{1(n+1)} \\ a_{21} & a_{22} - 1/\tau & \cdots & a_{2(n+1)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{(n+1)1} & a_{(n+1)2} & \cdots & a_{(n+1)(n+1)} - 1/\tau \end{vmatrix} = 0 \quad (16.94)$$

В принципе на основании тщательного измерения каждого времени релаксации как функции концентрации можно найти различные константы скорости. Во многих случаях, когда имеется более двух времен релаксации, они разделяются достаточно хорошо, так что для получения относительно простых приближенных выражений для времен релаксации можно применить упрощенные методы (которые мы использовали при анализе двухстадийного механизма).

Упростить анализ спектров времен релаксации позволяют матричные методы (Дополнение 16.2).

Дополнение 16.2

МАТРИЧНЫЙ ПОДХОД К РЕШЕНИЮ ЛИНЕАРИЗОВАННЫХ УРАВНЕНИЙ СКОРОСТИ

Систему линейных дифференциальных уравнений скорости удобно анализировать с использованием матричных методов. Преимущество этого подхода заключается в том, что он позволяет идентифицировать нормальные концентрационные переменные, связанные с любым механизмом, описываемым линейризованными уравнениями скорости. Эти переменные часто дают представление о физическом механизме процесса; они оказались также полезными для расчета других характеристик системы, например амплитуд релаксации (см. Eigen, de Maeyer, 1963).

Разберем общий реакционный механизм, содержащий n независимых химических форм; мы будем рассматривать концентрации этих форм, обозначенных C_i , где индекс i изменяется от 1 до n . Линеаризованные уравнения скорости имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} -d\Delta C_1/dt &= a_{11}\Delta C_1 + a_{12}\Delta C_2 + \cdots + a_{1n}\Delta C_n \\ -d\Delta C_2/dt &= a_{21}\Delta C_1 + a_{22}\Delta C_2 + \cdots + a_{2n}\Delta C_n \\ &\vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \end{aligned}$$

где a_{ij} — функции констант скорости и равновесных концентраций (см. текст). Решение этих уравнений имеет вид [ср. с уравнением (16.93)]

$$\Delta C_i = \sum_{j=1}^n A_{ij} e^{-t/\tau_j} \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n$$

где A_{ij} — константы, а параметры τ_j — времена релаксации, полученные при решении характеристического уравнения [ср. с уравнением (16.94)].

Необходимо найти набор концентрационных переменных y_i , релаксация которых к равновесным значениям описывается уравнениями

$$\Delta y_i = \Delta y_i^0 e^{-t/\tau_i} \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n$$

где Δy_i — отклонение y_i от его конечного равновесного значения, а Δy_i^0 — начальное отклонение при $t = 0$.

Величины y_i представляют собой нормальные концентрационные переменные, каждая из которых стремится к равновесию со своей собственной постоянной времени τ_i . Таким образом, каждая величина y_i ведет себя, как если бы она участвовала в одной независимой мономолекулярной реакции.

Связь между ΔC_i и Δy_i можно выразить следующим соотношением:

$$\Delta C_i = \sum_{j=1}^n T_{ij} \Delta y_j \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n$$

где T_{ij} — константы. В матричной записи (см. Приложение А) это соотношение можно представить в виде

$$\underline{\Delta C} = \underline{T} \underline{\Delta y}$$

где $\underline{\Delta C}$ и $\underline{\Delta y}$ — вектор-столбцы переменных ΔC_i и Δy_i , а $\underline{T}$ — квадратная матрица $n \times n$, элементами которой являются независимые от времени величины T_{ij} . Аналогичным образом можно записать приведенную выше систему линеаризованных уравнений скорости

$$-d \underline{\Delta C} / dt = \underline{a} \underline{\Delta C}$$

где $\underline{a}$ — квадратная матрица размером $n \times n$ с элементами a_{ij} . Используя соотношение $\underline{\Delta C} = \underline{T} \underline{\Delta y}$, можно записать эти уравнения скорости в следующей форме:

$$-d(\underline{T} \underline{\Delta y}) / dt = \underline{a} \underline{T} \underline{\Delta y}$$

или

$$-d \underline{\Delta y} / dt = \underline{T}^{-1} \underline{a} \underline{T} \underline{\Delta y}$$

где $\underline{T}^{-1}$ — матрица, обратная $\underline{T}$ (см. Приложение А). Если $\underline{T}$ построена из векторов собственных чисел матрицы $\underline{a}$ (см. Приложение А), то

$$\underline{T}^{-1} \underline{a} \underline{T} = \underline{\Lambda}$$

где

$$\underline{\Lambda} = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \lambda_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \lambda_n \end{bmatrix}$$

и

$$\lambda_i = 1/\tau_i$$

Таким образом, матрица $\underline{T}$, известная как преобразующая матрица, приводит систему уравнений скорости к диагональному виду

$$-d \Delta y_i / dt = -\Delta y_i / \tau_i$$

с простым решением $\Delta y_i = \Delta y_i^0 e^{-t/\tau_i}$. Следовательно, экспоненциальный член e^{-t/τ_i} описывает динамику переходного процесса для i -й нормальной концентрационной переменной.

НЕКОТОРЫЕ ВЫВОДЫ ИЗ ИССЛЕДОВАНИЙ КИНЕТИКИ БЫСТРЫХ РЕАКЦИЙ

Методы изучения быстрых реакций использовали при исследовании многих систем. Чтобы оценить достоверность некоторых полученных параметров скорости, полезно проанализировать теоретические ограничения величин бимолекулярной константы скорости k_1 (Дополнение 16.3). Рассмотрим взаимодействие молекул фермента и субстрата, имеющих сферическую форму. Пусть наименьшее расстояние между молекулами при сближении составляет r_0 (т.е. r_0 является суммой радиусов молекул) и константы диффузии молекул фермента и субстрата равны D_E и D_S соответственно. Если каждое соударение $E - S$ приводит к образованию комплекса, то (см. Дополнение 16.3)

$$k_1 = 4\pi r_0(D_E + D_S)10^{-3}N_0 \quad (16.95)$$

где N_0 — число Авогадро, r_0 выражено в см, $(D_E + D_S)$ имеет размерность $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, а k_1 — $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В действительности в уравнение (16.95) необходимо ввести множитель, учитывающий тот факт, что активный центр фермента занимает лишь незначительную часть общей поверхности молекулы и большое число соударений происходит не с активным центром. В случае малых молекул субстрата $D_S \gg D_E$ и $D_S \approx 10^{-5} \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Если предположить, что величина r составляет от $2 \cdot 10^{-7}$ до $4 \cdot 10^{-7}$ см и что число соударений с активным центром фермента составляет лишь незначительную часть общего числа соударений, то $k_1 \approx 10^9 \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Эта величина дает некоторое представление о диффузионно-контролируемом пределе k_1 ; большинство молекул, конечно, не имеет сферической формы и энергия взаимодействия между E и S может изменить частоту соударений. Тем не менее уравнение (16.95) дает возможность оценить порядок величины k_1 (см. Дополнение 16.3 и работу Hammes, 1978).

Дополнение 16.3

БИМОЛЕКУЛЯРНАЯ КОНСТАНТА СКОРОСТИ В СЛУЧАЕ РЕАКЦИИ, КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДИФФУЗИЕЙ

Выражение для бимолекулярной константы скорости в случае реакции, контролируемой диффузией, получают относительно просто. Рассмотрим реакцию $A + B \rightleftharpoons AB$. Для простоты предположим, что A и B являются нейтральными и не взаимодействующими молекулами, имеющими сферическую форму. [Уравнение можно также получить для взаимодействующих молекул (см. Hammes, 1978).] Мы хотим рассчитать скорость соударения молекул. Представим себе, что молекулы B неподвижны, а молекулы A диффундируют и соударяются с молекулами B . В соответствии с первым законом диффузии Фика поток J_A (число молекул A , проходящих через сечение 1 см^2 в 1 с) равен

$$J_A = -D_A \nabla C_A$$

где D_A — коэффициент диффузии, имеющий размерность $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, и C_A — концентрация, выраженная числом молекул в 1 см^3 (см. гл. 10, где обсуждаются законы Фика и коэффициенты диффузии). Уравнение первого закона Фика не имеет решения в общем виде, но мы можем получить его для стационарных условий, предположив, что $-\partial C_A / \partial t = 0$. Заметим вначале, что для молекул со сферической симметрией первый закон Фика имеет вид

$$J_A = -D_A \partial C_A / \partial r$$

где r — расстояние между центрами отдельных молекул. Общий направленный поток через сферическую поверхность радиуса r (с площадью $4\pi r^2$) равен

$$\mathcal{J}_A = -4\pi r^2 J_A = 4\pi r^2 D_A \partial C_A / \partial r$$

Так как поток стационарен, параметр $\mathcal{J}_A$ является постоянной величиной независимо от r . Поэтому $\mathcal{J}_A$ равен числу молекул А, которые переносятся через поверхность молекул В в единицу времени.

Чтобы получить выражение для $\mathcal{J}_A$ в более удобной форме, предположим, что наименьшее расстояние между центрами молекул, достигаемое при сближении, равно r_0 (в см) и $C_A = 0$ при $r = r_0$ и $C_A = \tilde{C}_A$ (концентрация вещества в общем объеме раствора) при $r = \infty$. Преобразуя и интегрируя выражение для $\mathcal{J}_A$, получаем

$$\mathcal{J}_A \int_{r_0}^{\infty} r^{-2} dr = 4\pi D_A \int_0^{\tilde{C}_A} dC_A$$

или

$$\mathcal{J}_A / r_0 = 4\pi D_A \tilde{C}_A$$

или

$$\mathcal{J}_A = 4\pi D_A r_0 \tilde{C}_A$$

Последнее уравнение дает число молекул А, сталкивающихся с молекулой В за 1 с. Чтобы учесть движение молекул В, заменим D_A на $D_A + D_B$ и получим следующее выражение для общего числа соударений в единицу времени со всеми молекулами В (при концентрации вещества в общем объеме раствора $\tilde{C}_B$):

$$\text{Скорость} = 4\pi(D_A + D_B)r_0 \tilde{C}_A \tilde{C}_B = k' \tilde{C}_A \tilde{C}_B$$

где k' — константа скорости второго порядка, имеющая размерность $\text{см}^3 \cdot \text{молекула}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Чтобы перейти к стандартным единицам ($\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), умножим k' на $10^{-3} N_0$ (где N_0 — число Авогадро):

$$k = 10^{-3} N_0 k' = 4\pi r_0 (D_A + D_B) 10^{-3} N_0$$

Более подробно эти вопросы обсуждаются в работе Hammes, 1978.

В табл. 16.2 приведены для ряда систем константы скорости k_1 и k_{-1} , характеризующие образование комплекса фермента с субстратом (или другими малыми молекулами). Из таблицы видно, что во многих случаях величины констант скорости второго порядка k_1 для процесса связывания природного субстрата с ферментом лежат в интервале $10^7 - 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; скорость таких взаимодействий несколько ниже скоростей процессов, контролируемых с помощью диффузии. Эти данные показывают также, что величина константы скорости в большой степени зависит от того, насколько фермент и субстрат соответствуют друг другу. Например, в случае связывания с аспаратаминотрансферазой ее природного субстрата, аспартата, k_1 составляет $10^7 - 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Однако при связывании с этим ферментом α -метиласпартата $k_1 = 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Эти два субстрата имеют следующую структуру:

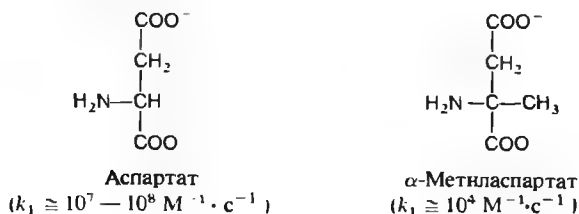


Таблица 16.2

КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ АССОЦИИИ И ДИССОЦИИИ ФЕРМЕНТ-ЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ¹⁾

Фермент	Лиганд	$k_1, \text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{-1}, \text{с}^{-1}$
Аспаратаминотрансфераза	Глутамат, аспарат	$> 10^7 - 10^8$	$> 10^5 - 10^6$
	Оксалоацетат, кетоглутарат	$> 10^8$	$> 10^4$
	α -Метиласпарат	$1,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^2$
	эритро- β -Гидроксиаспарат	$3,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^4$
Химотрипсин	NH_2OH	$3,7 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10$
	Профлавин	$1,1 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^3$
Креатинкиназа	Фурилакритоил-L-триптофанамида	$6,2 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^3$
	ADP	$2,2 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^4$
	Mg-ADP	$5,3 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^3$
	Ca-ADP	$1,7 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^3$
Лактатдегидрогеназа из мышц кролика	NADH	$\sim 10^9$	$\sim 10^4$
Лактатдегидрогеназа из серд- ца свиньи	NADH	$5,5 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10$
	Оксамат	$8,1 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10$
	3-Тио-NAD	$5,8 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^2$
	NADH	$5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10$
Малатдегидрогеназа	FMN	$1,5 \cdot 10^6$	$\sim 10^{-4}$
NADPH-дегидрогеназа	Пируват	$4,5 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^4$
Пируваткарбоксилаза-Mn ²⁺	Фторфосфат	$1,3 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^4$
Пируваткиназа-Mn ²⁺	Цитидин-3'-фосфат	$4,6 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^3$
Рибонуклеаза А	Уридин-3'-фосфат	$7,8 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^4$
	Цитидин-2',3'-циклофосфат	$2,4 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^4$
	Уридин-2',3'-циклофосфат	10^7	$2 \cdot 10^4$
	Цитидилил-3',5'-цитидин	$1,4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^3$

¹⁾ Hammes G. G., Schimmel P. R. In: The Enzymes, vol. 2, ed. P. D. Boyer, New York, Academic Press, 1970, p. 67.

Таким образом, простая замена атома Н (вандерваальсов радиус которого составляет $\sim 1,2 \text{ \AA}$) на группу CH_3 (вандерваальсов радиус которой составляет $\sim 1,9 \text{ \AA}$) приводит к изменению величины k_1 на 3-4 порядка.

Константы скорости диссоциации, приведенные в табл. 16.2, показывают диапазон значений этой величины. Эти константы отражают прочность связывания между ферментом и малыми молекулами.

При взаимодействии ферментов с малыми молекулами (например, субстратами), как правило, наблюдаются мономолекулярные конформационные изменения фермент-субстратных комплексов. В табл. 16.3 приведены некоторые значения времен релаксации таких процессов, определенные для различных систем. Многие из этих величин лежат в интервале $10^{-2} - 10^{-4} \text{ с}$. Скорость таких процессов достаточно велика, чтобы наблюдаемые конформационные изменения относились к основному пути катализа. Например, если для мономолекулярной стадии величина, обратная времени релаксации, меньше числа оборотов, то наблюдаемое конформационное изменение не является обязательной стадией катализа. Однако очень медленный конформационный переход может быть связан с механизмом регуляции активности фермента.

Таблица 16.3

ВРЕМЕНА РЕЛАКСАЦИИ МОНОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕРЕХОДОВ ФЕРМЕНТ-ЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ¹⁾

Фермент	Лиганд	Приблизительное значение времени релаксации, с
Щелочная фосфатаза	2-Гидрокси-5-нитробензилфосфат	10^{-2}
Аспаратаминотрансфераза	α -Метиласпартат	10^{-2}
	<i>эритро</i> - β -Гидроксиаспартат	от 10^{-3} до 10^{-1}
Химотрипсин	Профлавин	10^{-4}
	Фурилакрилоил-L-триптофанамида	10^{-2}
Креатинкиназа	ADP, Mg-ADP, Ca-ADP, Мп-ADP, ATP	10^{-4}
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	NAD	1
Лактатдегидрогеназа из мышц кролика	NADH	10^{-3}
Алкогольдегидрогеназа из печени	NADH-имидазол	10^{-3}
Пероксидаза	H_2O_2 , гидропероксид метила и этила	10^{-1}
Пируваткиназа	Субстрат отсутствует, Mg^{2+} , Mn^{2+}	10^{-4}
Рибонуклеаза А	Субстрат отсутствует, цитидин-3'-фосфат, уридин-3'-фосфат, цитидин-2',3'-циклофосфат, уридин-2',3'-циклофосфат, цитидилил-3',5'-цитидин	от 10^{-3} до 10^{-4}

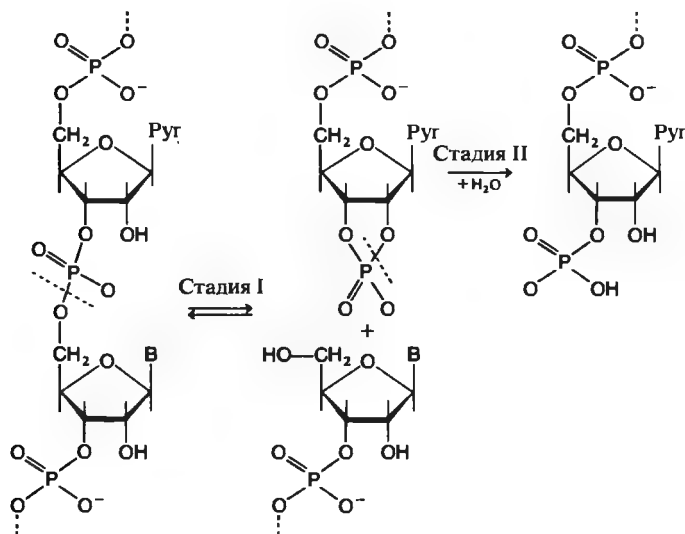
¹⁾ Hammes G. G., Schimmel P. R. In: The Enzymes, vol. 2, ed. P. D. Boyer, New York, Academic Press, 1970, p. 67.

Следует отметить, что при изучении кинетики релаксации не является необычным обнаружение нескольких дискретных релаксационных процессов, связанных с фермент-субстратными взаимодействиями. Действительно, в случае взаимодействия *эритро*- β -гидроксиаспартата с аспаратаминотрансферазой, которое приводит к образованию дигидроксифумарата и пиридоксаминовой формы фермента, измерено восемь времен релаксации. Таким образом, образование множественных промежуточных соединений в ходе катализа может быть общей особенностью ферментативных реакций.

16.8. Рибонуклеаза как пример ферментативной системы

Рибонуклеаза А является примером фермента, который достаточно подробно изучен с использованием кинетических и других методов. Молекула этого фермента образована единственной полипептидной цепью, содержащей 124 аминокислотных остатка, имеет мол. массу 13 600 и содержит четыре дисульфидные связи. Фермент обычно выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Рибонуклеаза катализирует специфическое расщепление цепей РНК за пиримидиновыми остатками с образованием 2', 3'-циклических фосфатов, которые затем гидролизуются до 3'-фосфатов. Схематически ферментативную реакцию можно представить следующим образом:

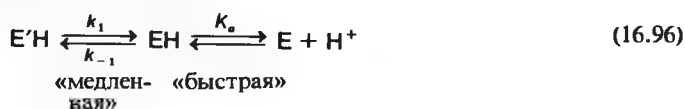


где Pyr — остаток пиридина, B — остаток пурина или пиридина. Фермент катализирует обе стадии реакции. Кроме того, рибонуклеаза катализирует гидролиз 2',3'-циклофосфатов уридина и цитидина до соответствующих 3'-фосфатов, причем равновесие реакции сильно сдвинуто в сторону образования продуктов. Большинство работ по исследованию механизма действия фермента относится к изучению гидролиза мононуклеотидов.

ВЫВОД ОБ ОБРАЗОВАНИИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ХОДЕ КАТАЛИЗА НА ОСНОВАНИИ КИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование стационарной кинетики гидролиза цитидин-2',3'-фосфата до цитидин-3'-фосфата показало, что реакция описывается относительно простой схемой, которая объясняет зависимость кинетических параметров от pH (Herries et al., 1962). Кинетический механизм реакции можно представить схемой (16.48), где S — цитидин-2',3'-фосфат, P — цитидин-3'-фосфат. Константы ионизации [уравнение (16.49)] составляют $\text{pK}_{\text{aE}} \cong 5,2$; $\text{pK}_{\text{aX}} \cong 6,3$; $\text{pK}_{\text{bE}} \cong 6,8$ и $\text{pK}_{\text{bX}} \cong 8,1$. Значения pK для свободного фермента дают основание предполагать, что существенными для катализа являются остатки гистидина; pK_{aE} можно отнести к аномальной карбоксильной группе фермента.

Однако изучение кинетики релаксации показало, что механизм реакции значительно сложнее (см. Hammes, 1968). Прежде всего, сам фермент подвергается мономолекулярному релаксационному превращению, которое сопряжено с быстрой стадией ионизации. Это можно записать в виде следующей схемы:

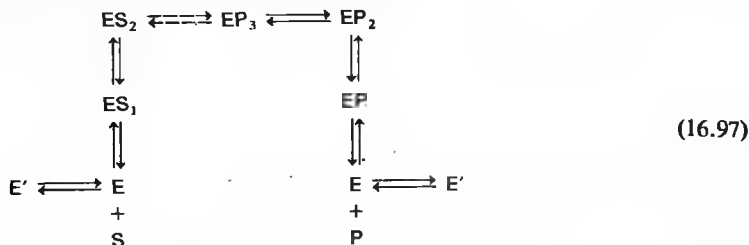


Переход $\text{E}'\text{H} \rightleftharpoons \text{EH}$ соответствует конформационному изменению фермента и характеризуется $k_1 = 780 \text{ с}^{-1}$ и $k_{-1} = 2470 \text{ с}^{-1}$. Стадия ионизации характеризуется $\text{pK}_a \cong 6,1$, и можно сказать почти определенно, что ионизируемой группой является остаток гистидина.

При добавлении к ферменту цитидин-3'-фосфата релаксационный эффект, связанный с конформационным изменением, постепенно уменьшается по мере увеличения концентрации нуклеотида. Это обусловлено тем, что цитидин-3'-фосфат связывается преимущественно с формами ЕН и Е, и это приводит к смещению равновесия реакции [уравнение (16.96)] вправо. Таким образом, форма Е'Н является инертным состоянием фермента.

Поскольку равновесие гидролиза циклического фосфата до 3'-фосфата сильно сдвинуто вправо, равновесная смесь нуклеотидов и фермента содержит главным образом свободный и связанный 3'-фосфат. Так как циклический фосфат присутствует в очень малых количествах, релаксационные эффекты, связанные с его взаимодействием с ферментом, нельзя обнаружить в равновесной смеси. Выход из создавшегося положения был найден при использовании комбинации методов остановленной струи и температурного скачка, когда фермент и циклический фосфат быстро смешивали и затем скачкообразно повышали температуру системы. При такой постановке эксперимента возмущение системы производилось до установления равновесия и были зарегистрированы отдельные релаксационные процессы, связанные с взаимодействиями циклического фосфата и фермента. Аналогичные исследования проводили и со смесью фермента и цитидин-3'-фосфата.

Результаты этих исследований суммированы в следующей схеме:



Прерывистыми стрелками обозначена стадия, лимитирующая общую скорость процесса. До и после этой лимитирующей стадии обнаружено шесть отдельных стадий, включая конформационное изменение свободного фермента.

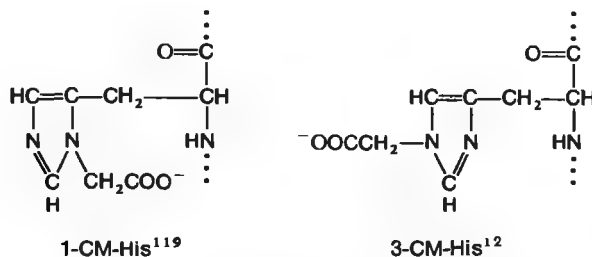
Приведенная выше схема является упрощенной, поскольку в ней опущены стадии ионизации фермента и его различных комплексов. В целом подразумеваются три значения pK (на одно значение pK больше, чем обнаружено при изучении стационарной кинетики); для свободного фермента — это группы с $pK \sim 5$; 6 и 6,7.

Эти кинетические исследования внесли определенную ясность в понимание последовательности элементарных стадий катализа. Однако многие решающие вопросы остались без ответа, например вопрос о локализации активного центра фермента и идентификации групп, участвующих в катализе. Для получения такого типа информации необходимо использовать другие методы.

МЕТОД ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

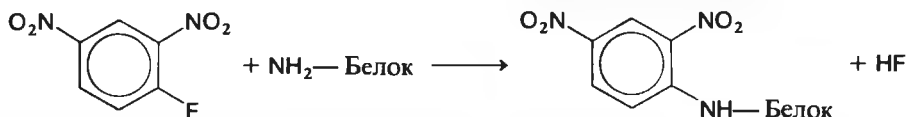
Для идентификации активных центров ферментов часто используют специфические реагенты, которые взаимодействуют с химическими группами, входящими в состав активного центра, в результате чего происходит полная инактивация фермента или значительное снижение ферментативной активности. В случае рибонуклеазы обнаружено, что иоацетат (ICH_2COO^-) при определенных условиях реагирует с ферментом в соотношении 1:1 (см. Crestfield et al., 1963). Из реакционной смеси были выделены два продукта реакции. Основным продуктом представляет собой 1-карбоксиметилгистидин-119 (1-СМ-His¹¹⁹), второй — 3-карбоксиметилгистидин-12 (3-СМ-His¹²). Эти продукты имеют следующую

структуру:



При образовании 1-CM-His¹¹⁹ фермент полностью теряет активность, тогда как при образовании второго аддукта модифицированный фермент сохраняет 15% исходной активности. На основании этих данных было сделано предположение, что в состав активного центра рибонуклеазы входят два остатка гистидина. Это предположение подтверждается экспериментами, в которых показано, что небольшие молекулы, например цитидин-3'-фосфат, связывающиеся в активном центре фермента, ингибируют процесс алкилирования. Кроме того, при алкилировании не получено формы рибонуклеазы, в которой были бы модифицированы оба остатка гистидина. Это, вероятно, объясняется тем, что два остатка гистидина, расположенные далеко друг от друга в аминокислотной последовательности, в нативной структуре фермента пространственно близки. И наконец, вполне вероятно, что один или оба остатка гистидина, модифицированные модацетатом, и некоторые ионизируемые группы, предполагаемые на основании рассмотренных выше кинетических исследований, идентичны.

Взаимодействие рибонуклеазы с фтординитробензолом (ФДНБ) — пример еще одной интересной модификации фермента. При определенных условиях этот реагент взаимодействует с ε-аминогруппой остатка Lys-41 с образованием неактивной производной формы фермента (Hirs et al., 1965). Реакция протекает следующим образом:



Эти результаты дают основание предположить, что Lys-41 также может входить в состав активного центра рибонуклеазы.

ВЛИЯНИЕ СУБТИЛИЗИНА НА РИБОНУКЛЕАЗУ

Дальнейшее доказательство важности остатков His-12 и His-119 для функционирования рибонуклеазы получено при исследовании фермента, модифицированного субтилизином. Субтилизин — это протеаза, расщепляющая полипептидную цепь рибонуклеазы между 20-м и 21-м остатками с образованием двух фрагментов, содержащих остатки 1-20 и 21-124 (см. Richards, Vithayathil, 1959). Выделенные фрагменты не обладают ферментативной активностью, однако после смешивания они рекомбинируют, образуя активный фермент, известный под названием рибонуклеаза S. Эти данные согласуются с выводом о том, что для проявления каталитической активности необходимы оба остатка гистидина.

Различные фрагменты полипептидной цепи рибонуклеазы удалось получить с использованием химического синтеза (см. Finn, Hoffman, 1965). Оказалось, что смесь фрагментов, содержащих аминокислотные остатки 1-11 и 21-124, не обладает ферментативной ак-

тивностью. Однако активность обнаруживается при смешивании фрагментов 1-12 и 21-124, что еще раз подтверждает важность His-12 для катализа.

АКТИВНЫЕ ДИМЕРЫ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Кристфилд и др. (Crestfield et al., 1963) получили интересные данные относительно димеризации рибонуклеазы. При лиофилизации рибонуклеазы из 50%-ной уксусной кислоты отмечено образование димеров фермента, активность которых (в расчете на моль димера) в два раза выше активности мономеров. Предполагая, что для активности существенны оба остатка гистидина: His-12 и His-119, эти данные можно объяснить частичным разворачиванием и димеризацией фермента, как это схематически представлено на рис. 16.11. Согласно схеме, остатки гистидина в димере группируются в две симметрично расположенные пары.

Справедливость такого механизма димеризации была показана с использованием рибонуклеазы, модифицированной иодацетатом. Рибонуклеазу, содержащую CM-His¹², смешивали с ферментом, содержащим CM-His¹¹⁹, и лиофилизовали. Согласно схеме на рис. 16.12, это должно было бы привести к образованию гибридных димеров (содержащих модифицированные и немодифицированные пары остатков гистидина), активность которых равна активности мономеров (один активный центр). Эксперименты подтверди-

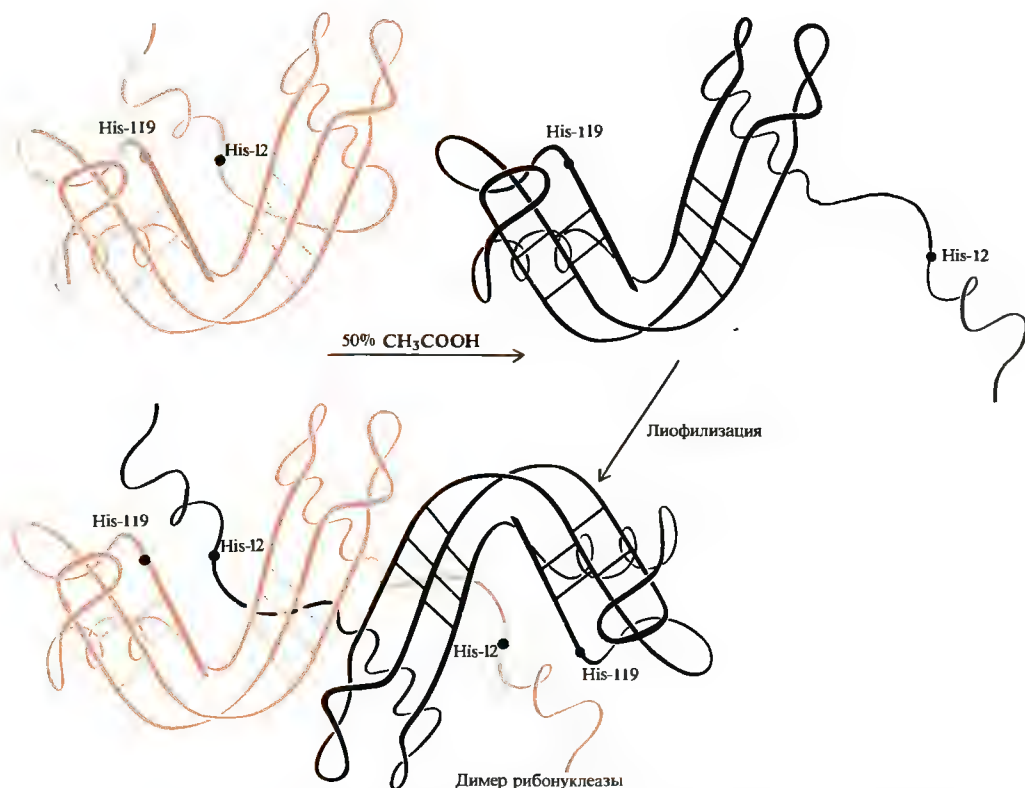


РИС. 16.11. Схематическое изображение процесса димеризации рибонуклеазы. Отмечено положение остатков His-12 и His-119 (рисунок Ирвинга Гейса).

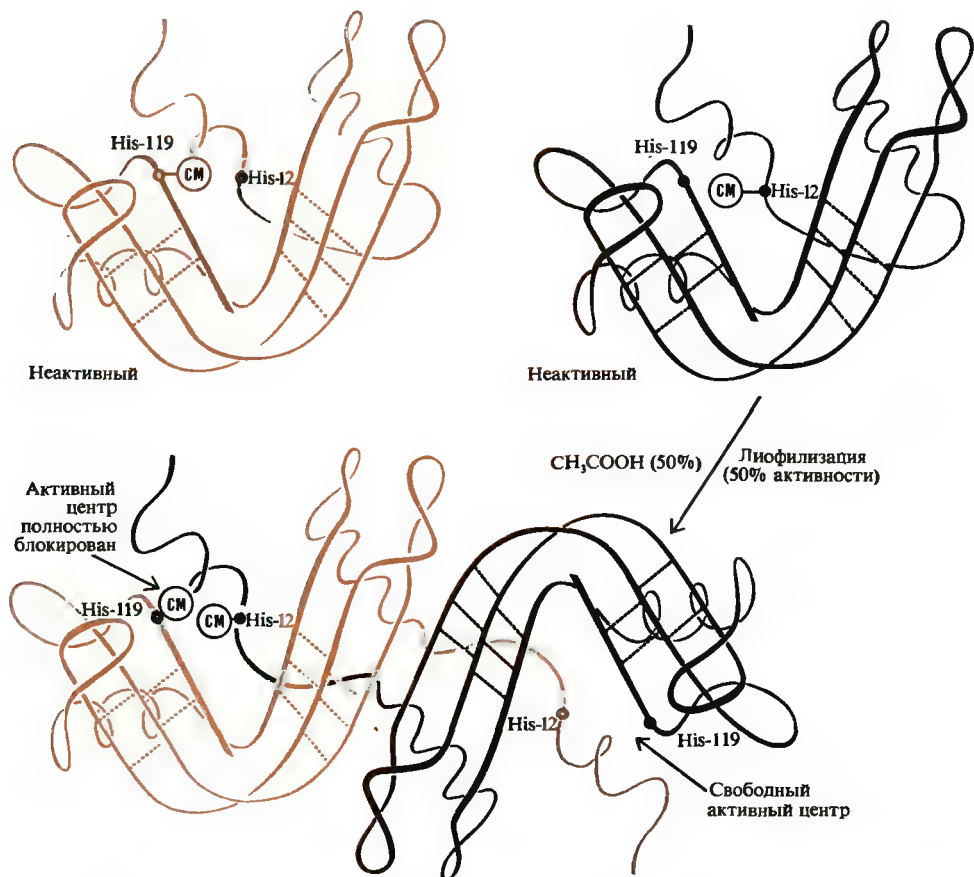


РИС. 16.12. Образование активных димеров рибонуклеазы из молекул, содержащих CM-His-12 и CM-His-119 (рисунок Ирвинга Гейса).

ли такое предположение, давая, таким образом, еще одно убедительное доказательство важности этих остатков гистидина для катализа.

ЧЕТЫРЕ ОСТАТКА ГИСТИДИНА, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ МЕТОДОМ ЯМР

Исследование методом ЯМР, выполненное Жардетским и сотр., является одним из наиболее информативных при изучении роли остатков гистидина в функционировании рибонуклеазы. С помощью ЯМР-спектроскопии (100 МГц) регистрируют протоны четырех остатков гистидина фермента (см. гл. 9 о ЯМР-спектроскопии). Каждый протон, связанный с С2-атомом имидазольной группы, характеризуется собственным химическим сдвигом, величина которого зависит от рН. Снимая зависимость химического сдвига от рН, можно построить кривые титрования (см. рис. 16.13). Кривые для протонов, связанных с С2-атомом остатков гистидина, пронумерованы на рис. 16.13 от 1 до 4. Кроме того, в спектре ЯМР присутствует еще один пик, приписываемый протону, связанному с С4-ато-

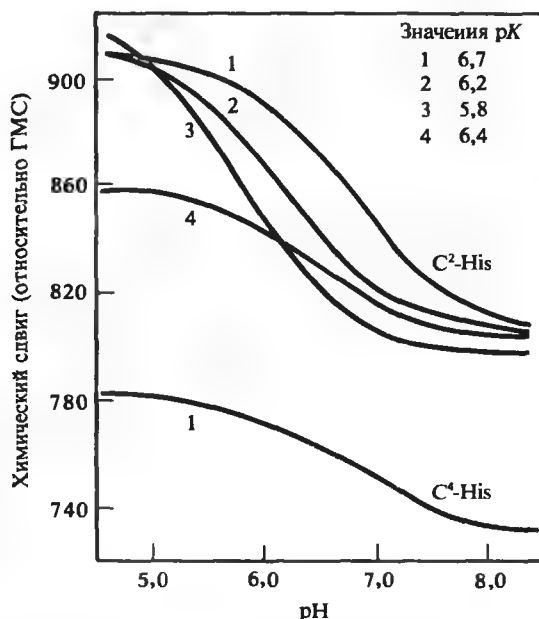


РИС. 16.13. Кривые титрования четырех остатков гистидина рибонуклеазы, полученные методом ЯМР, для протонов при С2-атоме четырех остатков гистидина и при С4-атоме остатка гистидина. Опыты проводили в 0,2 М дейтероацетатном буфере при температуре 32°C. ГМС — гексаметилдисилоксан. (Meadows et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 766, 1968.)

мом гистидина. Для него характерна та же величина рН, что и для пика 1, и можно, следовательно, предполагать, что пик 1 относится к этому же остатку гистидина.

В рибонуклеазе, содержащей 3-СМ-His¹² или 1-СМ-His¹¹⁹, пики 2 и 3 одновременно сдвигаются в сторону более высоких значений рК, тогда как положение пиков 1 и 4 не изменяется, т.е. карбоксиметилирование только одного остатка гистидина влияет на окружение двух остатков гистидина. Это означает, что два остатка гистидина должны быть расположены близко друг от друга и пики 2 и 3 можно отнести к His-12 и His-119. Конечно, на основании этих данных нельзя сказать, какой пик относится к His-12, а какой к His-119.

Пики 2 и 3 были идентифицированы Марклеем (Markley, 1975) на основании исследований методом ЯМР кинетики медленного обмена протона на дейтерий при С2-атоме четырех остатков гистидина. Каждый из остатков характеризуется своей кинетикой обмена, которую можно сравнить с результатами, полученными в эксперименте другого типа, где измеряли включение трития в эти четыре остатка. В последнем случае после инкубации фермента с тритием выделяли радиоактивные пептиды и определяли непосредственно степень обмена для каждого остатка гистидина. Эти два типа данных по кинетике обмена можно прямо сопоставить между собой и соотнести константу скорости, определенную с помощью ЯМР для какого-то пика, с константой скорости одного из остатков гистидина, определенной другим методом. Результаты показали, что His-12 соответствует пику 3, а His-119 — пику 2. Эти и другие данные указывают на то, что пики 4 и 1 можно отнести к остаткам His-48 и His-105 соответственно.

При связывании цитидин-3'-фосфата с рибонуклеазой значения рК остатков His-12 и His-119 резко увеличивается. Это согласуется с рассмотренными ранее результатами исследований стационарной кинетики, согласно которым образование фермент-субстратного комплекса приводит к увеличению значений рК двух групп фермента.

Положение пика, соответствующего His-105, при связывании цитидин-3'-фосфата не изменяется, тогда как пик, соответствующий His-48, несколько сдвигается и наблюдается

изменение ширины резонансной линии. На основании этих и других данных предполагают, что остаток His-48 может находиться по крайней мере в двух положениях, различающихся микроокружением, и может быстро переходить из одного положения в другое. На этот процесс, вероятно, влияет связывание цитидин-3'-фосфата. Поэтому не исключено, что His-48 является остатком, обуславливающим рН-зависимый релаксационный эффект [уравнение (16.96)], который был исследован Хаммесом и сотр.

СТРУКТУРА РИБОНУКЛЕАЗЫ ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

Исследования химическими и родственными им методами дают довольно хорошее представление о природе активного центра фермента. Наглядное представление о трехмерной структуре молекулы фермента и его активном центре дали рентгенокристаллографические исследования, которые выполнили Ричардс, Уайкоф, Карта, Белло и др. На рис. 16.14 представлена структура рибонуклеазы S. Молекула фермента напоминает по форме почку и имеет размеры $38 \times 28 \times 28 \text{ \AA}$. С одной стороны молекулы имеется четко выражен-

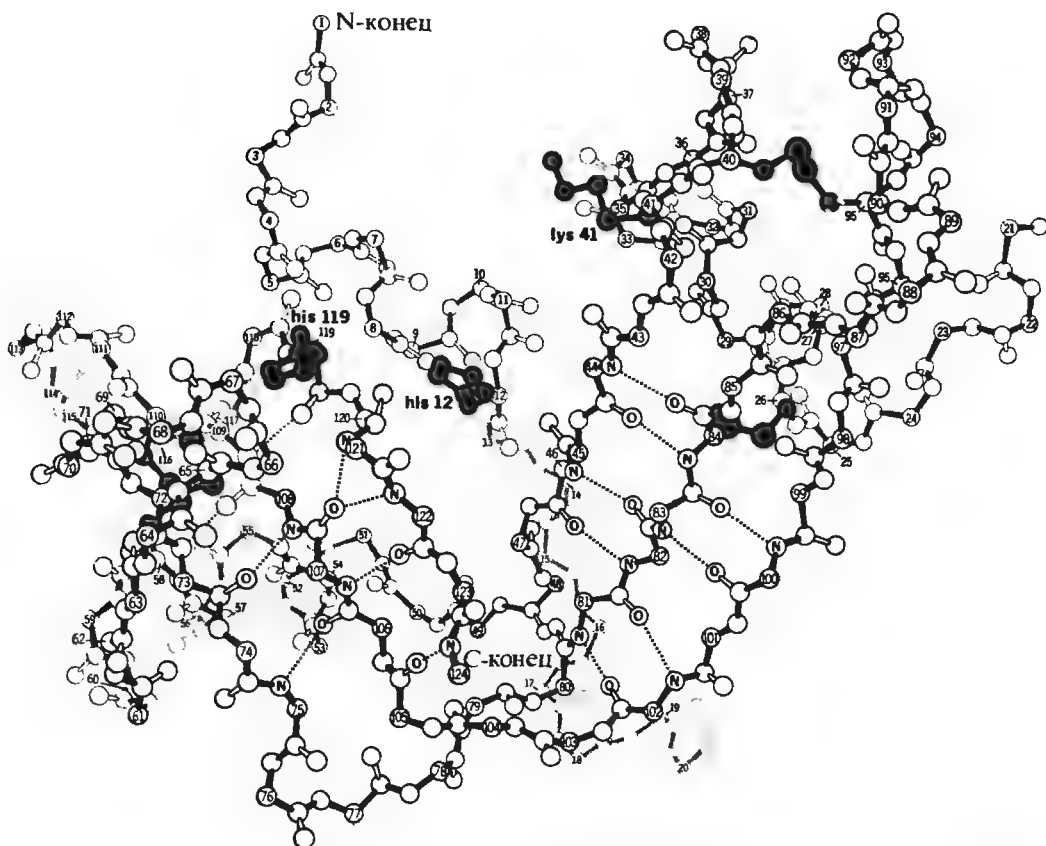


РИС. 16.14. Структура рибонуклеазы S по данным рентгеноструктурного анализа. Основная цепь представлена сплошной линией; боковые группы присоединены к основной цепи и пронумерованы (рисунок Ирвинга Гейса).

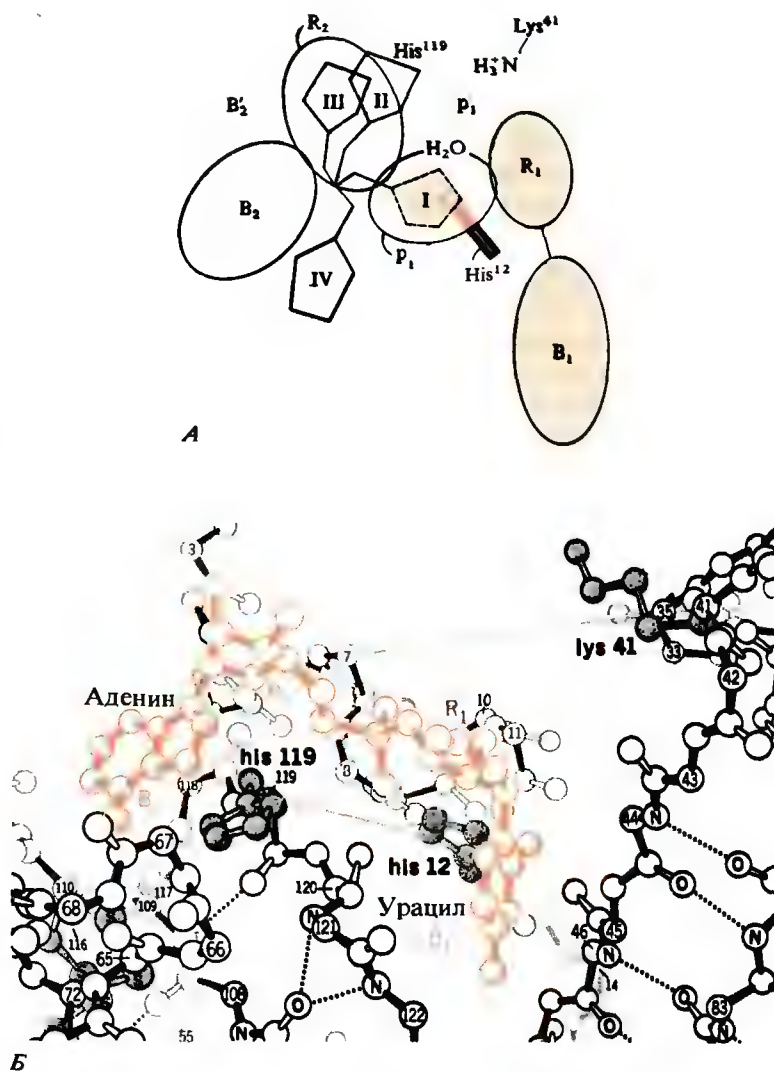


РИС. 16.15. Область активного центра рибонуклеазы А. А. Схематическое изображение ориентации субстрата — динуклеозидфосфата B_1pB_2 в активном центре рибонуклеазы (пояснения см. в тексте). (Richards F. M., Wyckoff H. W. In: *Atlas of Molecular Structures in Biology*, v. 1, London, Oxford Univ. Press, 1973). Б. Область активного центра рибонуклеазы S крупным планом. (Рисунок Ирвинга Гейса.)

ная расщелина и на кристаллах фермента, полученных в присутствии фосфата, показано, что P_i располагается в этом углублении. Последующие исследования с использованием аналогов субстрата подтвердили, что это углубление соответствует активному центру фермента. Остатки $His-12$ и $His-119$ находятся в области активного центра и расположены близко друг к другу. $His-41$ также локализован в области активного центра. Таким образом, выводы относительно остатков в активном центре фермента, полученные на основании исследований в растворе, оказались правильными.

На рис. 16.15, А схематически показана область активного центра рибонуклеазы, содержащей связанный субстрат — динуклеозидфосфат B_1pB_2 . Этот рисунок сделан на основании молекулярной модели области активного центра фермента, представленной на рис. 16.15, Б. На рис. 16.15, А овалами обозначены B_1 , R_1 и p_1 — основание, рибоза и фосфатный остаток первого мономерного звена динуклеозидфосфата, и B_2 и R_2 — основание и рибоза второго мономерного звена. Кроме того, показано другое возможное положение основания второго звена (B'_2) и положение циклического фосфата (p'_1). Когда фосфат находится в положении p_1 , остаток Lys-41 (расположенный вверх справа от фосфата) не может контактировать с фосфатной группой. Однако, когда фосфат находится в положении p'_1 , остаток лизина способен вступать с ним в контакт. His-12 локализован позади фосфатного остатка, тогда как His-119 может занимать любое из четырех положений, обозначенных римскими цифрами от I до IV. Точное положение His-119 зависит, по-видимому, от того, какая молекула связана с ферментом.

На рис. 16.16 показан двухстадийный механизм гидролиза динуклеозидфосфата CpA. Группы активного центра фермента на схеме не обозначены. В ходе первой стадии гидролиза образуется циклический фосфат, который может затем реагировать на второй стадии с 5'-ОН-группой аденозина с образованием динуклеозидфосфата или с H_2O с образованием 3'-CMP.

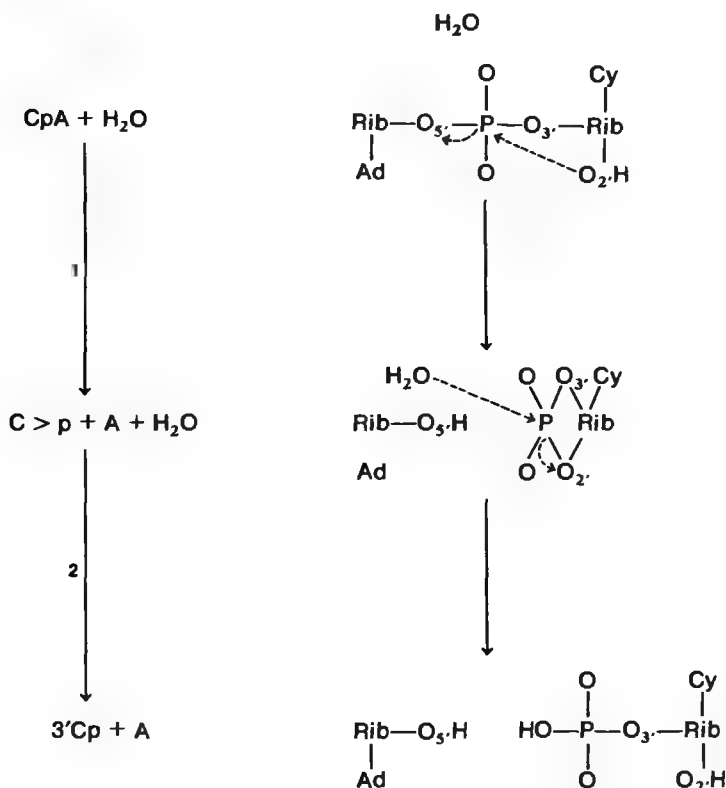


РИС. 16.16. Схематическое изображение механизма гидролиза динуклеозидфосфата CpA, катализируемого рибонуклеазой А (пояснения см. в тексте).

Для каждой стадии гидролиза рассматривались два возможных механизма. Согласно первому механизму (*"in-line" mechanism*), атакующий нуклеофил (2'-ОН группа рибозы на первой стадии или H_2O на второй стадии) подходит со стороны, противоположной той, на которой расположена уходящая группа. Согласно второму механизму (*"adjacent" mechanism*), атакующий нуклеофил подходит с той же стороны, на которой расположена уходящая группа. При поверхностном рассмотрении вторая стадия механизма (раскрытие кольца циклофосфата) выглядит как стадия, обратная первой (замыкание кольца с образованием циклофосфата). Поэтому можно было бы предположить, что обе стадии протекают по одному и тому же механизму. Однако на первой стадии атакующим нуклеофилом является 2'-ОН группа рибозы, а на второй — вода. Эти нуклеофилы не равноценны, поэтому нет оснований предполагать, что обе стадии протекают по одному и тому же механизму. Тем не менее исследования, выполненные в лабораториях Экштейна и Ашера, показали, что обе стадии гидролиза протекают по первому механизму (*in-line*), который представлен на рис. 16.16.

Остатки His-12 и His-119 действуют, вероятно, по механизму общего кислотно-основного катализа. Например, на первой стадии (образование циклофосфата) His-12 может выступать в роли основания и способствовать отрыву протона от 2'-ОН группы рибозы, которая соединяется с фосфатом, что приводит к образованию циклического 2',3'-фосфата. His-119 может действовать как кислотный катализатор, протонируя уходящую группу, что приводит к образованию 5'-ОН-рибозы. На второй стадии (раскрытие кольца циклофосфата) остатки гистидина меняются ролями и His-12 функционирует как кислота, а His-119 — как основание. Точная роль Lys-41 в катализе не ясна, однако положительный заряд этого остатка может стабилизировать переходное состояние атома фосфора с пятью ковалентными связями, которое имеет место при атаке фосфата ОН-группой (рибозы на стадии циклизации или воды на стадии дециклизации).

Таким образом, в понимании механизма реакции, катализируемой рибонуклеазой, достигнуты огромные успехи. На примере этого фермента мы дали лишь краткий обзор разнообразных методов, которые следует использовать при изучении механизма действия ферментов, однако большое число важных исследований здесь не рассматривалось. При этом необходимо отметить, что исследования с помощью физических методов (кинетика, рентгеноструктурный анализ и т.д.) хотя и дают очень ценную информацию, не всегда способны ответить на многие из возникающих вопросов. Естественно, что наилучшего понимания механизма действия ферментов достигают только при совокупном использовании данных, полученных как физико-химическими, так и любыми другими методами. Это хорошо показано на примере исследования рибонуклеазы.

Краткие выводы

Изучение динамических свойств биологических систем способствует лучшему пониманию взаимосвязей между их структурой, функцией и механизмом действия. Первичная цель таких исследований заключается в том, чтобы определить кинетические закономерности изучаемой системы и, таким образом, установить кинетический механизм процесса и характеризующие его параметры. Для последовательных мономолекулярных реакций решение уравнений скорости возможно, в то время как при анализе даже простых схем, включающих бимолекулярные стадии, возникают значительные трудности. В случае ферментативных реакций, которые являются наиболее хорошо изученными кинетическими системами, уравнения скорости обычно получают в упрощенной форме, используя принцип стационарности, когда предполагают, что каждая форма фермента находится в стационарном состоянии. На основании исследований стационарной кинетики в понимании механизма действия ферментов достигнуты значительные успехи.

Были разработаны методы для изучения очень быстрых переходных процессов, хотя трудности, связанные с решением уравнений скорости, иногда мешают анализу таких систем. Однако, даже если нельзя решить уравнения скорости, в случае многих кинетических систем решение можно найти для условий, близких к равновесным. Это делают линеаризацией уравнений скорости, что приводит к системе линейных дифференциальных уравнений, которую можно решить стандартными методами. Для исследования быстрых процессов вблизи равновесия можно использовать релаксационную спектрометрию, регистрируя кинетику перехода химических форм системы к новому положению равновесия. Такой подход привел к пониманию деталей многих процессов. При изучении спектров времен релаксации ферментативных реакций было обнаружено, что связывание субстрата (лиганда) с ферментом происходит с частотой на 1—2 порядка ниже предельной величины, соответствующей случаю диффузионного контроля. Кроме того, обнаружены конформационные изменения молекулы белка, время протекания которых составляет от 10^{-4} до 10^{-2} с.

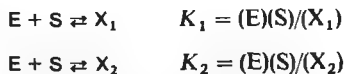
Рибонуклеаза является прекрасным примером ферментной системы, исследованной с использованием целого ряда методов, для которой кинетические данные рассмотрены в совокупности с другими. Проведено также кристаллографическое изучение этого фермента, поэтому можно наглядно представить себе молекулярный механизм некоторых стадий ферментативной реакции.

Задачи

16.1. Выведите уравнение $V = d(P)/dt$ для следующей кинетической схемы:



Выразите V через $(E)_0$ — общую концентрацию фермента, и (S) — концентрацию свободного субстрата. Можно предположить, что в ходе образования P в состоянии равновесия находятся следующие реакции:



В связи с этим нет необходимости использовать предположение о стационарном режиме протекания реакции. Первый из опрошенных студентов утверждает, что по форме уравнение скорости в случае схемы (A) не отличается от выражения Михаэлиса—Ментен для следующего простого механизма:



Он утверждает, что это справедливо независимо от относительных значений k_2 , k'_2 , K_1 и K_2 для схемы (A). Другой студент говорит, что концентрационные зависимости для схем (A) и (B) различаются при $k_2 \gg k'_2$ и $K_1 \ll K_2$. Третий студент утверждает, что уравнения скорости для этих двух механизмов будут иметь разную форму при любых условиях. Кто из студентов прав и прав ли кто-нибудь из них вообще?

16.2. Ферментативные реакции с участием нуклеозидфосфатов (например, АТФ) обычно активируются ионами двухвалентных металлов M . Рассмотрите для этого случая следующие данные, полученные при исследовании стационарной кинетики:

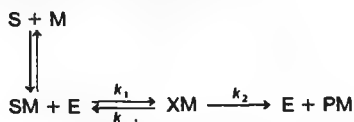
а. Графики Лайнуивера — Берка линейны.

б. Наклон графиков Лайнуивера — Берка обратно пропорционален концентрации ионов свободного металла (М).

в. Величины, определенные по точке пересечения с осью ординат графиков Лайнуивера — Берка, не зависят от концентрации М.

г. При данной концентрации субстрата скорость реакции намного ниже (но не равна нулю) в отсутствие металла, чем в его присутствии.

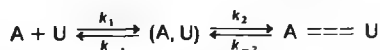
Предполагается следующий механизм реакции:



где равновесие $S + M \rightleftharpoons SM$ устанавливается очень быстро и характеризуется $K_{SM} = (S)(M)/(SM)$. (Диссоциацию $PM \rightleftharpoons P + M$ можно не учитывать.) Выведите уравнение стационарной скорости для этого механизма, выразив начальную скорость [когда $(PM) \equiv 0$] через $(E)_0$ — общую концентрацию фермента, $(S)_0 = (S) + (SM)$ — общую концентрацию субстрата и (M) — концентрацию свободного металла. Будет ли это уравнение скорости удовлетворительно описывать каждую из четырех зависимостей, перечисленных выше? Если уравнение не описывает одну или все зависимости, предложите, как следует изменить кинетическую схему, или предложите новый механизм, который может лучше объяснить экспериментальные данные.

16.3. Для некоторого фермента получены зависимости максимальной скорости V_S и константы Михаэлиса K_S в широком диапазоне значений pH. При pH от 7 до 8,5 V_S имеет максимальное значение, которое не зависит от pH. При значениях pH, меньших 7, V_S уменьшается, причем при pH 5 она уменьшается в два раза. При pH, больших 8,5, V_S также уменьшается, причем двукратное уменьшение наблюдается при pH 10,1. Однако во всем интервале K_S не зависит от pH. На основании только этих данных рассчитайте значение (или значения) pK группы (или групп), существенных для активности фермент-субстратного комплекса. Кроме того, рассчитайте значение pK этой же группы (групп) для свободного фермента.

16.4. Рассмотрите реакцию между аденозином (А) и уридином (U), которая приводит к образованию уотсон-криковской пары оснований. Предположим, что реакция протекает по следующей схеме:



где (А, U) — форма, в которой А и U сближены и образуют одну водородную связь, $A \equiv U$ — структура уотсон-криковской пары с двумя водородными связями. Мы предполагаем, что (А, U) — короткоживущая форма, которая присутствует в очень малых количествах (почему?). Поэтому при исследовании кинетики релаксации мы можем предположить, что $d\Delta((A, U))/dt = 0$ и $\Delta(A) = -\Delta((A, U)) - \Delta(A \equiv U) \equiv -\Delta(A \equiv U)$. Покажите, что вблизи равновесия при этих условиях изменение во времени $(A \equiv U)$ описывается выражением $\Delta(A \equiv U) = \Delta(A \equiv U)^0 \exp(-t/\tau)$, т.е. единственной экспонентой, несмотря на то что в схеме имеется две реакции. Покажите также, что

$$1/\tau = k_{-1}k_{-2} + [k_1k_2/(k_{-1} + k_2)][(A) + (U)]$$

Исследователь утверждает, что на основании одной кинетики релаксации он может от-

личить двухстадийный механизм, приведенный выше, от механизма, в котором есть только одна стадия $A + U \rightleftharpoons A = = U$. Прав ли он? Почему? Или почему не прав?

16.5. Выведите выражение для времени релаксации «очень медленной» стадии в случае следующего механизма:



ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Bernhard S.*, 1968. The Structure and Function of Enzymes, New York, Benjamin.
- Cleland W. W.*, 1970. Steady state kinetics. In: The Enzymes, Vol. 2, ed. P. D. Boyer, New York, Academic Press, p. 1. [Изложены основы стационарной кинетики с использованием номенклатуры, символов и работ автора в этой области. Статья во многом носит описательный характер и ставит своей целью дать интуитивное понимание особенностей стационарной кинетики.]
- Cornish-Bowden A.*, 1976. Principles of Enzyme Kinetics, London, Butterworth. (Имеется перевод: Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979.)
- Dixon M., Webb E. C.*, 1964. Enzymes, New York, Academic Press. (Имеется перевод 3-го издания: Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982.)
- Eigen M., de Maeyer L.*, 1963 Relaxation methods. In: Technique of Organic Chemistry, vol. 8, part 2, eds. S. L. Friess, E. S. Lewis, A. Weissberger, New York, Interscience, p. 895. [Классическая статья по теории и методологии релаксационной спектроскопии; обобщающая работа.]
- Fersht A.*, 1977. Enzyme Structure and Mechanism, San Francisco, W. H. Freeman and Company. (Имеется перевод: Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. — М.: Мир, 1980.)
- Hammes G. G., ed.*, 1974. Techniques of Chemistry, vol. 6, part 2, New York, Wiley (Interscience). [Рассматриваются элементарные стадии реакций в растворе и очень быстрые реакции.]
- Hammes G. G., ed.*, 1978. Principles of Chemical Kinetics, New York, Academic Press. [Одна из глав посвящена кинетике ферментативных реакций и кинетике быстрых реакций (рассматривается, например, релаксационная спектрометрия) и является хорошим введением к этим темам.]
- Hammes G. G., Schimmel P. R.*, 1970. Rapid reaction and transient states. In: The Enzymes, vol. 2, ed. P. D. Boyer, New York, Academic Press, p. 67. [Обсуждается кинетика быстрых реакций; особое внимание уделено релаксационной спектрометрии и ферментативным системам.]
- Jencks W. P.*, 1969. Catalysis in Chemistry and Enzymology, New York, McGraw-Hill. [Кинетика рассматривается в основном в аспекте физической органической химии.]
- Piskiewicz D.*, 1977. Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions, New York, Oxford Univ. Press.
- Walsh C.*, 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms, San Francisco, W. H. Freeman and Company.

Специальная

- Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S.*, 1963. Alkylation and identification of the histidine residues at the active site ribonuclease, J. Biol. Chem., **238**, 2413.
- Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S.*, 1963. Properties and conformation of the histidine residues at the active site of ribonuclease, J. Biol. Chem., **238**, 2421.
- Finn F. M., Hoffmann K.*, 1965. Studies on polypeptides, XXXIII: Enzymic properties of partially synthetic ribonuclease, J. Am. Chem. Soc., **87**, 645.
- Hammes G. G.*, 1968. Relaxation spectrometry of biological systems, Adv. Protein Chem., **23**, 1.
- Herries D. G., Mathias A. P., Rabin B. R.*, 1962. The active site and mechanism of bovine pancreatic ribonuclease, 3: The pH-dependence of the kinetic parameters for the hydrolysis of cytidine 2',3'-phosphate, Biochem. J., **85**, 127.
- Hirs C. H., Halmann M., Kycia J. H.*, 1965. Dinitrophenylation and inactivation of bovine pancreatic ribonuclease A. Arch. Biochem. Biophys., **111**, 209.

- Kartha G., Bello J., Harker D.*, 1967. Tertiary structure of ribonuclease. *Nature*, **213**, 862.
- Kraut J.*, 1977. Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 33. [Всестороннее исследование сериновых протеаз, пожалуй, даже более детальное, чем рибонуклеазы.]
- Markley J. L.*, 1975. Correlation proton magnetic resonance studies at 250 MHz of bovine pancreatic ribonuclease, I: Reinvestigation of the histidine peak assignments, *Biochemistry*, **14**, 3546.
- Miller W. G., Alberty R. A.*, 1958. Kinetics of the reversible Michaelis—Menten mechanism and the applicability of the steady-state approximation, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5146.
- Peller L., Alberty R. A.*, 1959. Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics, I: The mechanism involving a single substrate and product, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5907.
- Richards F. M., Vithayathil P. J.*, 1959. The preparation of subtilisin modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1459.
- Richards F. M., Wyckoff H. W.*, 1970. Bovine pancreatic ribonuclease. In: *The Enzymes*, vol. 4, ed. P. D. Boyer, New York, Academic Press, p. 647.
- Usher D. A., Erenrich E. S., Eckstein F.*, 1972. Geometry of the first step in the action of ribonuclease A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 115.
- Usher D. A., Richardson D. I., Jr., Eckstein F.*, 1970. Absolute stereochemistry of the second step of ribonuclease action, *Nature*, **228**, 663.

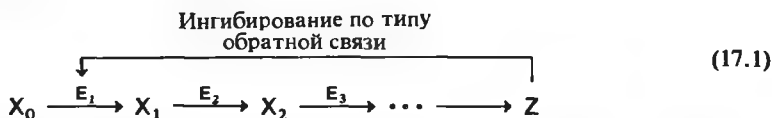
Глава 17 Регуляция биологической активности

17.1. Биологическая регуляция

В гл. 15 и 16 мы обсудили особенности равновесия и кинетики взаимодействия лигандов с макромолекулами. Акцент был сделан на общих закономерностях, чтобы выявить основные принципы. В этой главе мы рассмотрим специальные свойства макромолекул, связанные с регуляцией биологической активности, на двух особенно ярких примерах: аспартат-карбамоилтрансферазе и гемоглобине. Эти две хорошо изученные системы прекрасно иллюстрируют, как биологическая активность регулируется с помощью мультилигандных взаимодействий. Кроме того, они дают возможность и проиллюстрировать, и проверить теории, которые были развиты для объяснения регуляции биологической активности белков.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПО ТИПУ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Хорошим примером биологической регуляции может служить явление *ингибирования по типу обратной связи*. Рассмотрим процесс, в котором предшественник X_0 превращается с помощью ряда реакций в соединение Z , причем каждая стадия процесса катализируется специфическим ферментом E_i . Во многих случаях оказывается, что независимо от того, какое количество X_0 вводится, система не вырабатывает непрерывно соответствующее количество Z , если Z не выводится из системы по мере его образования. Причиной этого является то, что само соединение Z по типу обратной связи ингибирует фермент (E_1), который превращает X_0 в следующее промежуточное соединение (X_1) на пути к конечному продукту Z :



По мере накопления Z его концентрация становится достаточно большой для того, чтобы ингибировать E_1 . В этом процессе Z регулирует свой собственный синтез. Ингибирование обратимо, т.е. при уменьшении концентрации (Z) ингибирование E_1 снимается и система вновь может синтезировать Z . Заметим, что клетка эффективно избегает излишних затрат метаболической энергии путем воздействия Z только на первый фермент в цепи реакций.

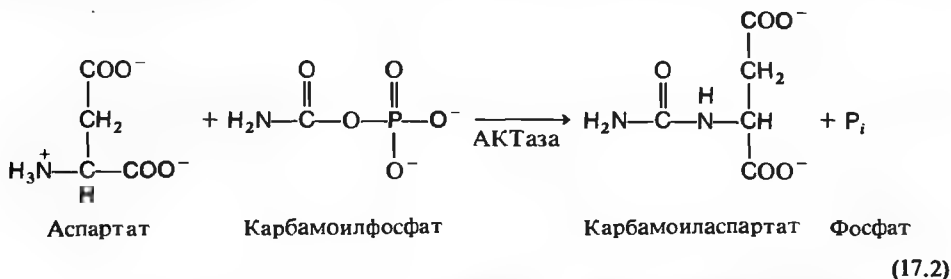
В большинстве случаев конечный продукт Z не имеет структурного сходства с X . Поэтому Z не является конкурентным ингибитором E_1 . E_1 имеет специальное, отдельное место связывания, которое специфически предназначено для узнавания Z .

Примером сказанному выше может служить биосинтез нуклеиновых кислот. В быстро делящихся и растущих клетках нуклеиновые кислоты непрерывно синтезируются по общей схеме: предшественники $\rightarrow \dots \rightarrow$ нуклеотиды $\rightarrow \dots \rightarrow$ нуклеиновые кислоты. Однако, если по какой-либо причине синтез нуклеиновой кислоты замедляется, количество нуклеотидов не накапливается до бесконечности даже при наличии предшественни-

ков, т.е. при замедлении процесса превращения нуклеотидов в нуклеиновые кислоты синтез нуклеотидов также ингибируется.

МЕТАБОЛИЗМ ПИРИМИДИНА И АСПАРТАТ-КАРБАМОИЛТРАНСФЕРАЗА

Рассмотрим хорошо изученную реакцию ингибирования по типу обратной связи, которая входит в метаболический цикл пириимидина и катализируется аспартат-карбамоилтрансферазой (АКТазой).



В этой реакции происходит конденсация аспартата и карбамоилфосфата с образованием карбамоиласпартата. За ней следует несколько стадий, с помощью которых карбамоиласпартат превращается в пириимидиннуклеозидтрифосфат УТР и затем в СТР. Конечный продукт, СТР, в свою очередь по типу обратной связи ингибирует АКТазу.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

АКТаза известна как аллостерический белок ("allo" означает «другой»). Так называют обычно белки, которые имеют места связывания (регуляторные места), специфические для физиологических молекул, регулирующих активность белка. Эти места отличаются от мест связывания субстрата в активном центре. Аллостерические белки обладают рядом особенностей, которые мы вначале проиллюстрируем, а затем дадим их количественный анализ. Мы воспользуемся АКТазой как примером в связи с тем, что она хорошо изучена. Однако применение рассмотренных ниже концепций не ограничивается одной этой системой.

17.2. Некоторые особенности и свойства аллостерических ферментов

СИГМОИДНЫЕ КРИВЫЕ

Замечательной особенностью аллостерических ферментов является то, что кинетика катализируемых ими реакций обычно описывается негиперболической кривой.

На рис. 17.1 сравниваются зависимости начальной скорости реакций v_i от концентрации субстрата (S) для обычного неаллостерического и аллостерического ферментов. Для аллостерического фермента наблюдается сигмоидная кривая, т.е. при низких концентрациях субстрата скорость мало чувствительна к увеличению его концентрации, однако по мере роста концентрации субстрата достигается такое значение этой концентрации, при котором скорость начинает резко возрастать в ответ на небольшое увеличение концентрации субстрата. Другими словами, обнаруживается кооперативный характер процесса.

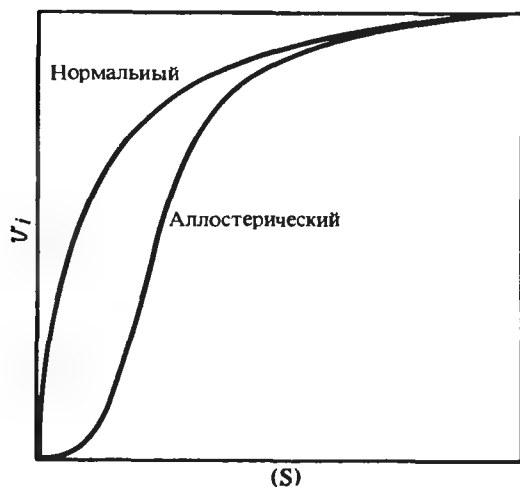


РИС. 17.1. Гиперболическая и сигмоидная кинетические кривые. Зависимость начальной скорости реакции v_i от концентрации субстрата (S) для обычного неаллостерического фермента имеет вид гиперболы, а для аллостерического фермента — сигмоидной кривой.

Этот тип кинетики резко отличается от гиперболической зависимости Михаэлиса — Ментен для обычного неаллостерического фермента.

Благодаря сигмоидной зависимости v_i от (S) фермент способен резко изменять скорость образования продукта в ответ на небольшие изменения концентрации субстрата.

ВЛИЯНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА

Рис. 17.2 иллюстрирует влияние аллостерического ингибитора — СТР в случае АКТаза — на зависимость v_i от (S) . В приведенном примере ингибитор (СТР) сдвигает сигмоидную кривую вправо, так что для достижения скорости, характерной для фермента в отсутствие СТР, необходимы более высокие концентрации субстрата (аспартата). При достаточно больших значениях (S) влияние ингибитора ослабляется. Из-за того, что при больших (S) ингибирование может быть подавлено, ситуация оказывается внешне сходной с простым конкурентным ингибированием.

Однако в случае АКТаза имеется особенность, присущая аллостерическому ингибированию, благодаря которой оно отличается от простого конкурентного ингибирования.

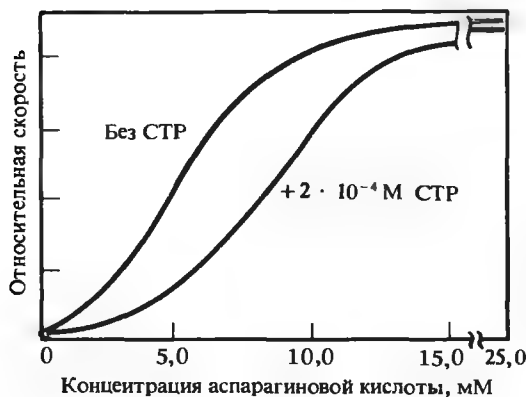


РИС. 17.2. Влияние аллостерического ингибитора. Относительная скорость реакции приведена как функция концентрации субстрата (аспартата) для АКТаза в присутствии и в отсутствие аллостерического ингибитора СТР. (Gerhart J. C., Pardee A. B., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 491, 1963.)

РИС. 17.3. Конкурентное ингибирование для обычного фермента. Представлена зависимость ингибирования в процентах от концентрации ингибитора.

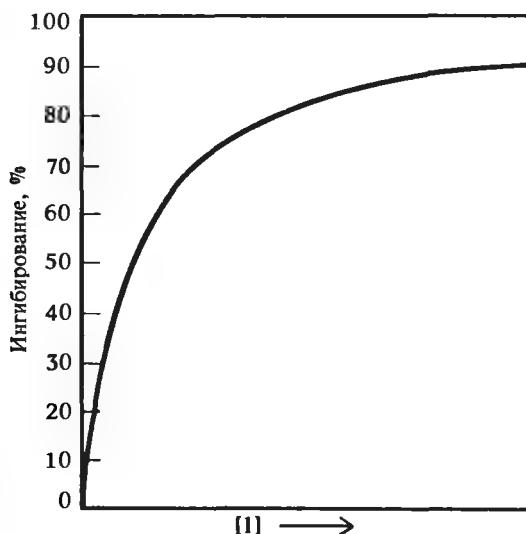
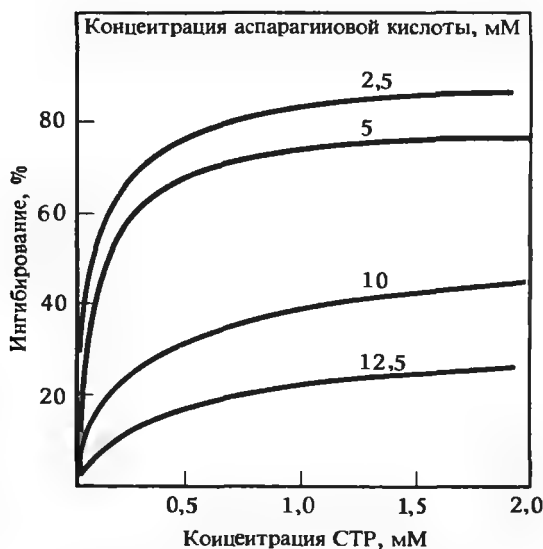


РИС. 17.4. Аллостерическое ингибирование. Приведена зависимость ингибирования АКТаза в процентах от концентрации ингибитора (СТР) для разных концентраций субстрата (аспартата). (Gerhart J. C., Pardee A. B., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 491, 1963.)



Построим кривую зависимости ингибирования в процентах от концентрации ингибитора (I) при неизменном значении (S). Для конкурентного ингибитора обычного фермента эта кривая представляет собой гиперболу (Дополнение 17.1), и в конечном счете достигается 100%-ный уровень ингибирования (рис. 17.3). Более того, общая форма кривой не меняется и при более высоких значениях (S), хотя для 100%-ного ингибирования необходимы большие количества ингибитора. В случае АКТаза ситуация совершенно другая. Как видно на рис. 17.4, максимальный уровень ингибирования, который достигается при использовании СТР, зависит от концентрации аспартата (субстрата). Чем выше концентрации S, тем ниже предельные уровни ингибирования. Отсюда следует, что СТР не может по-

лностью нейтрализовать влияние субстрата. Вместе с тем аспартат может полностью подавить действие СТР (рис. 17.2), т.е. наблюдается не симметричная по отношению к двум лигандам ситуация: *СТР не может полностью подавить действие аспартата, но аспартат может полностью подавить ингибирование с помощью СТР*. Эта необычная взаимосвязь между СТР и аспартатом резко отличает рассматриваемую систему от обычной системы конкурентного ингибирования.

Дополнение 17.1

КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

К простому механизму, описываемому уравнением (16.33), мы можем добавить связывание конкурентного ингибитора I:



Мы предполагаем, что процесс установления равновесия для связывания ингибитора является быстрым по сравнению со скоростью суммарной реакции [уравнение (16.33)], так что при вычислении концентраций I и EI можно воспользоваться константой равновесия K_I . Далее легко показать, что если суммарная концентрация ингибитора намного превышает суммарную концентрацию фермента, то уравнение (16.37) принимает вид

$$v_1 = V_s / \{1 + [K_s/(S)_0][1 + (I)_0/K_I]\}$$

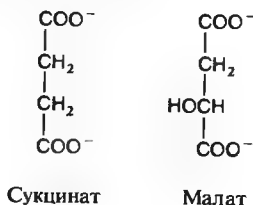
и ингибирование в процентах ($I_{\%}$) описывается уравнением

$$\begin{aligned} I_{\%} &= \left(1 - \frac{V_s / \{1 + [K_s/(S)_0][1 + (I)_0/K_I]\}}{V_s / [1 + K_s/(S)_0]}\right) \times 100 \\ &= \left(\frac{[K_s/(S)_0][(I)_0/K_I]}{1 + [K_s/(S)_0][1 + (I)_0/K_I]}\right) \times 100 \end{aligned}$$

Таким образом, при постоянном значении $(S)_0$ зависимость $I_{\%}$ от $(I)_0$ выражается простой гиперболой.

ВЛИЯНИЕ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИТОРА

Влияние истинного конкурентного ингибитора также необычно. Малат и сукцинат являются структурными аналогами аспартата, которые предположительно конкурируют с аспартатом за места связывания на ферменте.



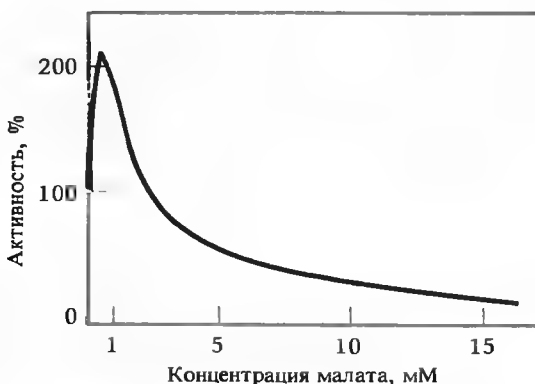


РИС. 17.5. Активирование и ингибирование АКТаза малатом. (Gerhart J. C., Pardee A. B., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 491: 1963.)

Однако в данном случае эффект от малата, например, изменяется при увеличении концентрации аспартата (рис. 17.5). Как видно на графике зависимости активности в процентах от концентрации малата (в интервале низких концентраций аспартата), при низких концентрациях малата фермент имеет более высокую активность, чем без него, а при более высоких концентрациях малата наступает ингибирование и его степень растет до тех пор, пока активность вообще не исчезает. Таким образом, в зависимости от концентрации малат может быть как активатором, так и ингибитором. Вместе с тем при гораздо более высоких концентрациях аспартата (на рисунке не показано) добавки малата приводят только к ингибированию, независимо от его уже имеющейся концентрации в системе.

Аллостерические белки всегда построены из нескольких единиц. АКТаза состоит из шести каталитических (К) и шести регуляторных (Р) цепей. Каждая из К-цепей имеет мол. массу $\sim 33\,000$, а каждая из Р-цепей $\sim 17\,000$. В интактной молекуле имеется шесть мест связывания для аспартата и карбамоилфосфата на К-цепях и шесть мест связывания для СТР на Р-цепях.

Хотя детальной модели структуры АКТаза пока еще нет, в изучении ее строения достигнут значительный прогресс. Работа с этим ферментом, схематическое изображение структуры которого дано на рис. 2.49, велась под руководством Вильяма Липскомба (William Lipscomb). Фермент имеет одну ось симметрии 3-го порядка и три оси 2-го порядка. Субъединицы скомпонованы следующим образом: выше и ниже блока из трех димеров Р-цепей расположено по одному тримеру из К-цепей. Максимальный размер молекулы составляет $110 \times 110 \times 90 \text{ \AA}$.

Химические свойства и структурные особенности ясно свидетельствуют о том, что аллостерические ферменты, например АКТаза, сильно отличаются от многих других ферментов. Поэтому для объяснения необычных свойств аллостерических ферментов были разработаны специальные модели, подвергшиеся впоследствии ряду экспериментальных проверок.

17.3. Модель Моно — Уаймена — Шанжё (МУШ) для аллостерических ферментов

В моделях функционирования аллостерических белков, как правило, придается большое значение конформационным состояниям субъединиц и взаимодействию между субъединицами. Благодаря своей простоте очень популярна и часто цитируется модель Моно, Уаймена и Шанжё (Monod et al., 1965), которую мы будем сокращенно называть моделью МУШ. Хотя эта модель и неприменима ко всем системам, в ней содержатся представле-

ния, которые полезны при обсуждении аллостерических систем и, кроме того, она имеет очень простое алгебраическое описание.

В модели различают протомеры и субъединицы. Протомер — это структурная единица, которая содержит в себе одно место связывания для каждого из лигандов. Субъединица же — это одиночная полипептидная цепь. Следовательно, протомер может состоять более чем из одной субъединицы. В случае АКТаза протомер состоит из одной Р- и одной К-цепи.

ЧЕТЫРЕ ОСНОВНЫХ ДОПУЩЕНИЯ

В модели МУШ содержатся четыре существенных допущения.

1. Идентичные протомеры занимают эквивалентные положения в белке. Это означает, что молекула имеет по крайней мере одну ось симметрии.

2. Каждый протомер содержит уникальный рецепторный участок для каждого специфического лиганда.

3. Белок может находиться по крайней мере в двух конформационных состояниях, переход между которыми обратим. В каждом из этих состояний симметрия сохраняется. Однако сродство данного лиганда к белку может сильно различаться в разных конформационных состояниях последнего.

4. Константа связывания специфического лиганда зависит только от конформационного состояния фермента, но не зависит от того, заняты или свободны соседние места связывания.

ГОМОТРОПНЫЕ И ГЕТЕРОТРОПНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

В модели делаются различия между *гомотропными* и *гетеротропными* взаимодействиями. Когда прочность связывания лиганда зависит от того, как много молекул одного и того же лиганда уже связано, то говорят о гомотропных взаимодействиях. Такие взаимодействия описываются сигмовидной кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 17.1). Если же связывание лиганда одного типа со своим стереоспецифическим участком влияет на константу связывания лиганда второго типа, то в этом случае говорят о гетеротропных взаимодействиях. Примером такого взаимодействия может служить влияние СТР на зависимость скорости реакции от концентрации аспартата (рис. 17.2).

АЛГЕБРАИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ МУШ

Для того чтобы дать алгебраическое описание модели, рассмотрим белок, состоящий из четырех протомеров ($n = 4$). Каждый протомер может существовать в любом из двух конформационных состояний, находящихся в обратимом равновесии. Согласно обозначениям модели МУШ, эти состояния называются релаксированным (R) и напряженным (T). Они симметричны, и мы можем схематически изобразить их следующим образом:



R



T



Нерассматриваемая форма

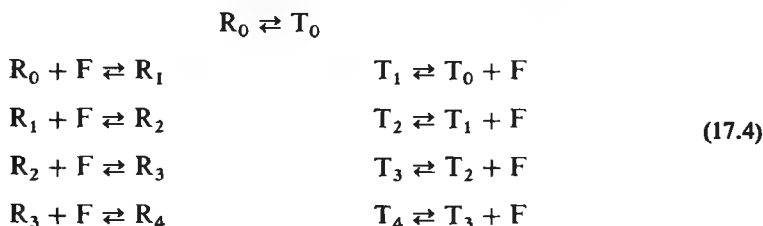
где каждый кружок или квадрат обозначают протомер. Правая структура и другие аналогичные формы исключаются из рассмотрения как энергетически невыгодные, поскольку они не удовлетворяют требованию симметрии (допущение 3 в модели).

В соответствии с допущением 4, для того чтобы охарактеризовать связывание лиганда F с ферментом, необходимы только две микроскопические константы диссоциации. Эти микроскопические константы обозначают символами k_R и k_T , где k_R можно записать, например, как

$$k_R = \frac{\left(\begin{smallmatrix} \textcircled{\text{O}} & \textcircled{\text{O}} \\ \textcircled{\text{O}} & \textcircled{\text{O}} \end{smallmatrix} \right) (F)}{\left(\begin{smallmatrix} \textcircled{\text{O}} & \textcircled{\text{F}} \\ \textcircled{\text{O}} & \textcircled{\text{O}} \end{smallmatrix} \right)} = \frac{\left(\begin{smallmatrix} \textcircled{\text{O}} & \textcircled{\text{F}} \\ \textcircled{\text{F}} & \textcircled{\text{O}} \end{smallmatrix} \right) (F)}{\left(\begin{smallmatrix} \textcircled{\text{O}} & \textcircled{\text{F}} \\ \textcircled{\text{F}} & \textcircled{\text{F}} \end{smallmatrix} \right)} = \dots \quad (17.3)$$

Аналогичное выражение можно написать для k_T . Обычно $k_R \neq k_T$, т.е. лиганд преимущественно связывается либо с одной формой, либо с другой (при $k_R = k_T$ два состояния неразличимы, если речь идет о связывании F).

Для процесса связывания лиганда F можно написать следующие равновесные реакции:



В этой схеме R_i обозначает набор всех микросостояний молекулы в конформации R с числом i связанных молекул F. Число микросостояний, которое включено в символ R_i , равно $\Omega_{n,i}$ с $n = 4$ [см. уравнение (15.14)]. Например, для $i = 2$ имеется 6 микросостояний. Точно такой же анализ применим и к T_i .

Чтобы рассчитать кривую насыщения для лиганда F, удобно иметь дело с макроскопическими константами равновесия, которые в свою очередь пропорциональны соответствующим микроскопическим константам. Эти макроскопические константы равны

$$k_R/4 = (R_0)(F)/(R_1) \quad (17.5a)$$

$$2k_R/3 = (R_1)(F)/(R_2) \quad (17.5b)$$

$$3k_R/2 = (R_2)(F)/(R_3) \quad (17.5b)$$

$$4k_R = (R_3)(F)/(R_4) \quad (17.5r)$$

Аналогичные выражения можно написать и для k_T в случае T-формы белка. Исходя из уже известного смысла константы k_R , соотношения (17.5) легко получить из уравнения (15.14) с $n = 4$. Концентрацию удобно выражать в виде безразмерного параметра $\alpha = (F)/k_R$. При этом концентрация F выражается в единицах микроскопической константы диссоциации k_R . Кроме того, запишем соотношение $k_T = k_R/c$, где c — константа. (Если $c < 1$, то F связывается более прочно с белком в R-состоянии, чем с белком в T-состоянии.) Используя эти параметры, из уравнений (17.5) и аналогичных

уравнений для Т-формы получим следующие соотношения:

$$(R_1) = 4(R_0)\alpha \quad (T_1) = 4L(R_0)c\alpha \quad (17.6a)$$

$$(R_2) = 6(R_0)\alpha^2 \quad (T_2) = 6L(R_0)c^2\alpha^2 \quad (17.6b)$$

$$(R_3) = 4(R_0)\alpha^3 \quad (T_3) = 4L(R_0)c^3\alpha^3 \quad (17.6b)$$

$$(R_4) = (R_0)\alpha^4 \quad (T_4) = L(R_0)c^4\alpha^4 \quad (17.6r)$$

где L — константа равновесия для превращения $R_0 \rightleftharpoons T_0$ ¹

$$L = (T_0)/(R_0) \quad (17.7)$$

Степень насыщения $\bar{y}_F$ для лиганда F равна

$$\bar{y}_F = \frac{\sum_i i(R_i) + \sum_i i(T_i)}{4[\sum_i i(R_i) + \sum_i i(T_i)]} \quad (17.8)$$

где числитель в правой части — это число занятых лигандом F мест связывания, а знаменатель — общее число мест связывания. Члены в уравнении (17.8) легко рассчитать:

$$\sum_{i=0}^4 (R_i) = (R_0)(1 + 4\alpha + 6\alpha^2 + 4\alpha^3 + \alpha^4) = (R_0)(1 + \alpha)^4 \quad (17.9)$$

$$\sum_{i=0}^4 (T_i) = L(R_0)(1 + c\alpha)^4 \quad (17.10)$$

$$\sum_{i=0}^4 i(R_i) = \alpha \frac{d}{d\alpha} \sum_{i=0}^4 (R_i) = 4(R_0)\alpha(1 + \alpha)^3 \quad (17.11)$$

$$\sum_{i=0}^4 i(T_i) = 4L(R_0)c\alpha(1 + c\alpha)^3 \quad (17.12)$$

Подставляя эти соотношения в уравнение (17.8), мы находим для y_F в случае четырех протомеров:

$$y_F = \frac{\alpha(1 + \alpha)^3 + Lc\alpha(1 + c\alpha)^3}{(1 + \alpha)^4 + L(1 + c\alpha)^4} \quad (17.13)$$

В общем случае для белка с числом протомеров n мы имеем

$$y_F = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n} \quad (17.14)$$

¹ В дополнение к равновесию $R_0 \rightleftharpoons T_0$ мы должны были бы включить в уравнение (17.4) конформационные равновесия $R_1 \rightleftharpoons T_1$, $R_2 \rightleftharpoons T_2$ и т.д. Однако они не являются термодинамически независимыми равновесиями. Например, равновесное отношение $(R_2)/(T_2)$ определяется параметрами k_R , k_T и L [см. уравнение (17.6)]. Поэтому при расчете любой равновесной характеристики модели нет необходимости рассматривать другие конформационные равновесия.

Заметим, что если $L = 0$, то

$$\bar{y}_F = \alpha / (1 + \alpha) \quad (17.15)$$

Это обычное выражение, которое описывает гиперболическую кривую насыщения для взаимодействия лиганда F с идентичными и независимыми местами связывания в молекуле белка [ср. с уравнением (15.28)].

СВОЙСТВА $\bar{y}_F$: ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ L И c

Целесообразно проанализировать свойства $\bar{y}_F$ при различных условиях. Например, рассмотрим случай, когда $n = 4$, $c = 0$ и $L \gg 1$. В этом случае фермент начинает функционировать, в основном находясь в Т-состоянии, но лиганд связывается исключительно с белком в R-состоянии. Для этого частного случая уравнение (17.13) принимает вид

$$\bar{y}_F = \frac{\alpha(1 + \alpha)^3}{(1 + \alpha)^4 + L} \quad (17.16)$$

Если $\alpha \ll 1$, то $\bar{y}_F \cong \alpha/L$. Другими словами $\bar{y}_F$ увеличивается линейно с ростом α , но с незначительным наклоном, равным L^{-1} . Когда $1 \cong \alpha \ll L$, $\bar{y}_F \cong \alpha/L + 3\alpha^2/L + 3\alpha^3/L + \alpha^4/L$, т.е. $\bar{y}_F$ начинает быстро изменяться в ответ на небольшие изменения α . Наконец, если $\alpha \cong L$, то $\bar{y}_F \cong 1$.

Такая зависимость для $n = 4$, $c = 0$ и $L = 10^3$ схематически изображена на рис. 17.6. Сигмоидный характер кривой вполне очевиден. Легко видеть, что, когда между субстратом и участками его связывания на аллостерическом ферменте быстро устанавливается равновесие (по сравнению со скоростью катализа), зависимость между скоростью катализа и концентрацией субстрата пропорциональна $\bar{y}_F$. В таких случаях рис. 17.6 в равной степени применим для иллюстрации зависимости от концентрации субстрата как скорости катализа, так и связывания.

Из уравнения (17.16) следует, что и начальный наклон при низких значениях α , и резкий подъем кривой насыщения зависят от величины L . На рис. 17.7 для случая $c = 0$ и $n = 4$ показано несколько зависимостей $\bar{y}_F$ от α для разных значений константы конформационного равновесия L . Видно, что по мере увеличения L сигмоидность, связанная с гомотроп-

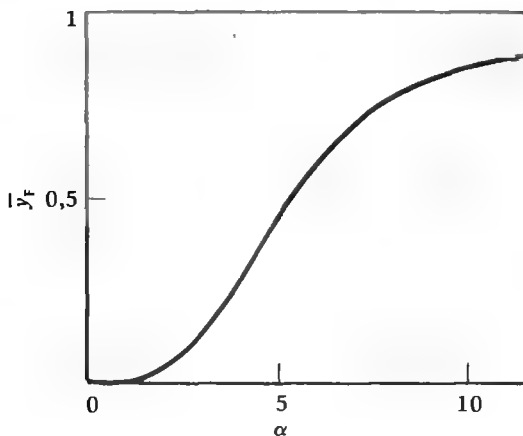


РИС. 17.6. Зависимость $\bar{y}_F$ от α для $n = 4$, $c = 0$ и $L = 10^3$.

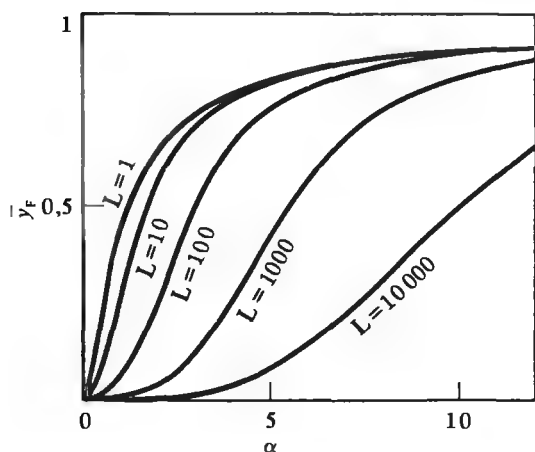


РИС. 17.7. Влияние изменения L на зависимость $\bar{y}_F$ от α для значений $c = 0$ и $n = 4$. (Monod J., Wyman J., Changeux J.-P., J. Mol. Biol., 12, 88, 1965.)

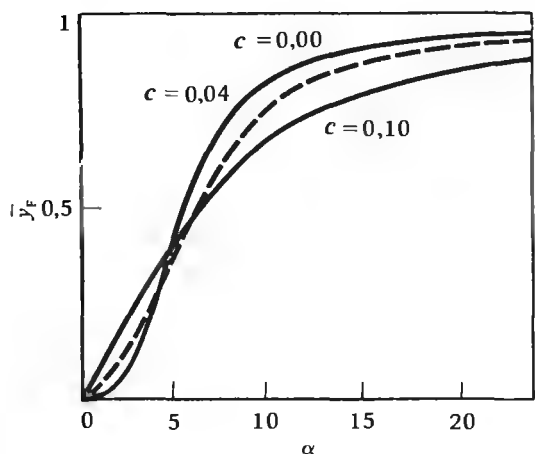


РИС. 17.8. Влияние изменения c на зависимость $\bar{y}_F$ от α для значений $L = 10^3$ и $n = 4$. (Monod J., Wyman J., Changeux J.-P., J. Mol. Biol., 12, 88, 1965.)

ными взаимодействиями, также возрастает. Таким образом, если лиганд связывается только с белком в R-состоянии, кажущаяся кооперативность тем больше, чем большая часть белка исходно находится в состоянии T.

На рис. 17.8 показано, как влияет на кривую насыщения изменение параметра c при $L = 10^3$ и $n = 4$. Из рисунка видно, что сигмоидность кривой насыщения уменьшается при стремлении c к единице. Как уже отмечалось ранее, в предельном случае, когда $c = 1$, две конформации фермента неразличимы по отношению к лиганду F.

Вообще наибольшая кооперативность достигается тогда, когда L велико, а c мало (или, наоборот, если F преимущественно связывается с белком в T-состоянии, то наибольшая кооперативность имеет место при малых значениях L и больших значениях c). Такое поведение является следствием допущения 3 в модели МУШ, согласно которому при переходе белка из одной конформации в другую симметрия системы сохраняется. Это означает, что все субъединицы изменяют свою конформацию согласованно. Таким образом, когда L велико, большая часть молекул белка первоначально находится в состоянии T_0 . Связывание лиганда F (только с молекулами в состоянии R_0) и образование молекул в состоянии

R_1 немного сдвигает суммарное равновесие, описываемое уравнением (17.4), влево, поскольку часть молекул переходит из состояния T_0 в состояние R_0 для того, чтобы вновь установилось равновесие $R_0 \rightleftharpoons T_0$. При этом, однако, происходит непропорционально большое увеличение числа мест, доступных для лиганда F: связывание одной молекулы F с одним местом связывания как бы «подталкивает» все n протомеры (с числом n мест связывания) к переходу в состояние R, что следует из постулированного механизма согласованных конформационных изменений. Таким способом достигается кооперативность процесса, так как число мест, доступных для F, возрастает во много раз быстрее, чем число молекул, претерпевших переход в состояние R. Конечно, по мере увеличения количества связанных молекул F практически все молекулы белка оказываются в состоянии R еще до их полного насыщения лигандом. На этой стадии процесс связывания уже не столь чувствителен к концентрации F, как прежде.

Эти представления становятся более наглядными, если рассмотреть зависимость параметра R (доли молекул в состоянии R) от (F) и сравнить ее с соответствующей зависимостью для y_F .

СРАВНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ $\bar{R}$ И $\bar{y}_F$

Параметр $\bar{R}$, доля молекул в состоянии R, дается уравнениями

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=0}^n (R_i)}{\sum_{i=0}^n [(R_i) + (T_i)]} \quad (17.17)$$

$$\bar{R} = (1 + \alpha)^n [(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n] \quad (17.18)$$

Уравнение (17.18) получено из уравнения (17.17) подстановкой в него выражений для $\sum_i (R_i)$ и $\sum_i (T_i)$, аналогичных уравнениям (17.9) и (17.10) для случая $n = 4$.

Рассмотрим конкретный пример, когда $n = 4$, $c = 0$ и $L = 10^3$. Выражение для $\bar{y}_F$ дается уравнением (17.16). При $\alpha = 0$ из уравнения (17.18) имеем $R \equiv L^{-1} = 0,001$, $y_F = 0$. R и y_F практически равны друг другу. Однако при $\alpha = 3$ имеем $R = 0,2$ и $y_F = 0,15$, т.е. R значительно больше, чем y_F . Это означает, что в состоянии R находится много молекул, но они только частично насыщены лигандом. Таким образом, эти молекулы имеют вакантные для F места в конформации, которая соответствует исключительному связыванию F (из-за предположения, что $c = 0$). Следовательно, когда $\alpha = 0$, для присоединения F доступны только 0,1% молекул (и 0,1% общего числа мест связывания). Однако по достижении значения $\alpha = 3$ в состоянии R находится около 5% общего числа мест связывания, которые являются вакантными (разность $R - y_F$ дает долю вакантных мест в R-состоянии). Таким образом, при изменении α от 0 до 3 происходит огромное увеличение числа вакантных мест, находящихся в подходящей конформации для связывания F. Этот статистический эффект ответствен за резко выраженный кооперативный характер процесса связывания. Как уже отмечалось, в основе его лежит допущение, согласно которому все субъединицы изменяют свою конформацию согласованно.

Конечно, по мере возрастания α оба параметра, y_F и R , стремятся к единице. Полностью насыщенные молекулы находятся только в состоянии R (для рассмотренного примера, когда $c = 0$).

ВЛИЯНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ

Согласно модели МУШ, аллостерические активаторы и ингибиторы связываются с молекулами белка, находящимися преимущественно в R-(активатор) или T-(ингибитор) со-

стояниях, в местах, отличных от каталитических мест, и это связывание сопровождается возникновением гетеротропных взаимодействий.

Для простоты предположим, что активатор А связывается только с R-формой, а ингибитор I — исключительно с T-формой фермента. Пусть k_{AR} и k_{IT} — микроскопические константы диссоциации для связывания активатора и ингибитора соответственно. В общем случае предположим, что I и А присутствуют одновременно. Определим параметр L' следующим образом:

$$L' = \sum_{i=0}^n (T_{0,i}) / \sum_{i=0}^n (R_{0,i}) \quad (17.19)$$

где индекс i в числителе указывает число молекул ингибитора, присоединенных к молекуле белка в T-форме, которая не связана с F, а индекс i в знаменателе — число молекул активатора, присоединенных к молекуле белка в R-форме, которая не связана с F. Следовательно, выражения в числителе и знаменателе всего лишь суммарные концентрации молекул, не связанных с F. Ранее их обозначали (T_0) и (R_0) соответственно. Таким образом, параметр L' является точным аналогом параметра L , и эти два параметра идентичны, когда (I) = (A) = 0. Делая такие же преобразования, как в уравнении (17.9), находим

$$\sum_{i=0}^n (R_{0,i}) = (R_{0,0})(1 + \gamma)^n \quad (17.20a)$$

$$\sum_{i=0}^n (T_{0,i}) = (T_{0,0})(1 + \beta)^n \quad (17.20b)$$

и

$$L' = L(1 + \beta)^n / (1 + \gamma)^n \quad (17.21)$$

где $\beta = (I)/k_{IT}$, $\gamma = (A)/k_{AR}$ и, как прежде, $L = (T_{0,0})/(R_{0,0})$. Теперь, точно так же как и раньше [уравнения (17.8) — (17.14)], можно вывести выражение для y_F и получить уравнение (17.14), в котором L заменено на L' . Следовательно, в модели МУШ аллостерические активаторы и ингибиторы влияют на величину конформационной константы равновесия L .

На рис. 17.9 показано влияние β и γ на зависимость y_F от α для случая $n = 4$, $c = 0$ и $L = 10^3$. Очевидно, характер зависимости y_F от (F) очень чувствителен к (I) и (A).

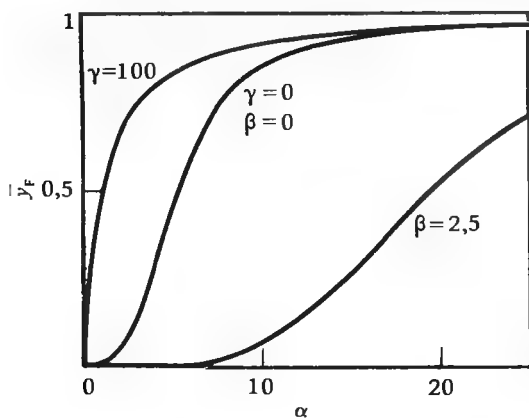


РИС. 17.9. Влияние аллостерических активатора и ингибитора на зависимость y_F от α для значений $c = 0$, $n = 4$ и $L = 10^3$. (Monod J., Wyman J., Changeux J.-P., J. Mol. Biol., 12, 88, 1965.)

17.4. Экспериментальная проверка модели МУШ

ОБЪЯСНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ДАННЫХ ПО ВЗАИМОДЕЙСТВИЮ ЛИГАНДОВ

Основной вопрос состоит в том, может ли модель МУШ объяснить наблюдаемые факты и можно ли подвергнуть ее решающей проверке в дальнейших экспериментах. В случае АКТазы важными являются экспериментальные факты, согласно которым СТР не может полностью подавить эффект от субстрата аспартата, а аспартат способен нейтрализовать влияние СТР (рис. 17.2 и 17.4). Этот факт легко объяснить, если предположить, что аспартат связывается только с белком в состоянии R ($c = 0$) и что СТР связывается предпочтительно (но не исключительно) с белком в состоянии T. Следовательно, добавление достаточного количества аспартата способствует переходу фермента полностью в состояние R. Вместе с тем, хотя СТР и вызывает ингибирование, смещая равновесие в сторону T-формы, он не может перевести белок полностью в состояние T. Поскольку постулируется, что СТР имеет некоторое сродство к R-форме, степень смещения равновесия в сторону состояния T зависит от концентрации аспартата. При больших концентрациях аспартата влияние СТР уменьшено, так как большая часть его связана с белком в R-форме, а при низких концентрациях аспартата наблюдается более сильный сдвиг в сторону состояния T в присутствии молекул СТР. Эти эффекты можно количественно оценить с помощью модели, выбрав подходящие значения различных аллостерических параметров.

Не менее важен также экспериментальный факт, согласно которому при низких концентрациях аспартата его конкурент малат может быть либо активатором, либо ингибитором (см. рис. 17.5). Рассматриваемая модель позволяет дать объяснение этому свойству. Если константа L велика, при низких концентрациях аспартата фермент находится в основном в состоянии T. В присутствии небольших концентраций малата, который, подобно аспартату, связывается с белком, находящимся исключительно в R-форме, конкурент способствует переходу части молекул белка из состояния T в состояние R. Более того, присоединение молекулы конкурента только к одному из n мест связывания (для АКТазы $n = 6$) стабилизирует все n мест в R-форме. Выше было показано, что при низких степенях насыщения последняя определяется в основном параметром $\bar{R}$. Поэтому, хотя малат и блокирует потенциальное место связывания для аспартата, он также сдвигает конформационное равновесие и стабилизирует R-форму, которая имеет *вакантные* места связывания для аспартата. Этим объясняется наблюдаемое активирующее влияние малата. Конечно, по мере увеличения концентрации малата все более значительная часть мест связывания становится занятой молекулами конкурирующего ингибитора, и, таким образом, в конце концов происходит ингибирование.

СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ КОНФОРМАЦИОННЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ И СТЕПЕНЬЮ НАСЫЩЕНИЯ

Хотя приведенные выше экспериментальные факты и можно объяснить с помощью модели МУШ, желательна более прямая проверка некоторых предсказаний модели. Очевидно, одним из наиболее важных является допущение о том, что аллостерические эффекты являются следствием конформационных изменений. Если это так, то конформационные изменения и кривая степени насыщения при кооперативном связывании лиганда не должны совпадать: конформационные изменения ($\bar{R}$) должны опережать изменение степени насыщения. Шахман (Schachman) и сотр. поставили специальные опыты для того, чтобы исследовать этот вопрос.

При титровании активного каталитического тримера АКТа́зы, состоящего из трех К-цепей, аналогом субстрата сукцинатом обнаруживается небольшое систематическое увеличение коэффициента седиментации s . На рис. 17.10 показано процентное увеличение величины s в зависимости от концентрации сукцината. Можно видеть, что по мере связывания молекул сукцината коэффициент седиментации изменяется между двумя предельными значениями. Это свидетельствует о том, что при связывании сукцината в каталитическом тримере происходят структурные изменения (изменения коэффициента трения).

На рис. 17.10 показано также «конформационное» титрование нативной молекулы. В этом случае коэффициент седиментации тоже изменяется между двумя предельными значениями. Однако при связывании сукцината наблюдается уменьшение, а не увеличение величины s . Это различие между интактной молекулой и изолированным тримером, возможно, связано с дополнительными изменениями в интактной структуре помимо тех, которые имеют место в каталитическом тримере. Во всяком случае, эти данные свидетельствуют о том, что по мере связывания лиганда действительно происходят конформационные изменения, и, таким образом, они подтверждают одно из допущений модели.

Более существенный вопрос, однако, заключается в том, какова связь между относительными изменениями конформации и степенью насыщения для сукцината. Ответ на этот вопрос искали путем введения в К-цепи маркера, спектральные свойства которого изменяются при связывании сукцината. Для этой цели каталитические тримеры обрабатывали тетранитрометаном таким образом, чтобы получить приблизительно один остаток нитротирозина на К-цепь. Максимум поглощения этого остатка находится при 430 нм, т.е. достаточно сильно удален от полосы поглощения белка, которая расположена при длинах волн, меньших 300 нм.

В достаточно хорошем приближении нитропроизводное тримера по своим каталитическим свойствам сходно с немодифицированным тримером, что свидетельствует об отсутствии серьезных изменений в молекуле при ее нитровании.

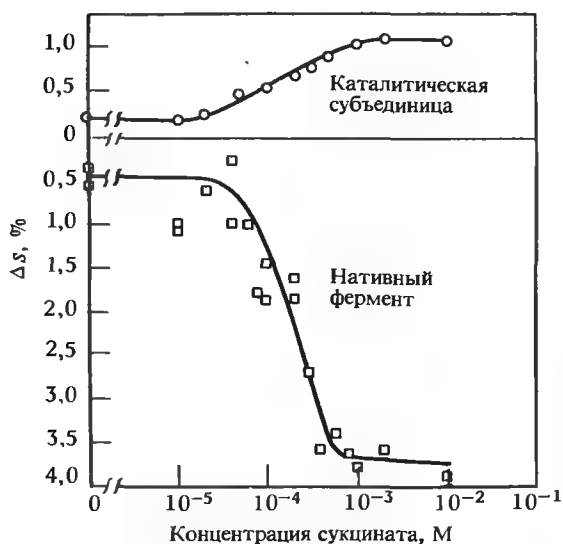
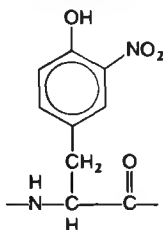


РИС. 17.10. «Конформационное» титрование АКТа́зы и каталитических субъединиц. Приведена зависимость процентного изменения коэффициента седиментации от логарифма концентрации сукцината. (Kirschner M. W., Schachman H. K., *Biochemistry*, **10**, 1919, 1971.)



Обычно эксперименты проводят в присутствии количества карбамоилфосфата, достаточного для насыщения белка. За связыванием сукцината можно следить спектрофотометрически по изменению оптической плотности при 430 нм. Титрование каталитического тримера до полного насыщения сукцинатом сопровождается примерно 14%-ным уменьшением оптической плотности при 430 нм. Однако кооперативных эффектов при связывании сукцината с тримерами нет. Это означает, что для кооперативности необходимы изменения четвертичной структуры интактного фермента. Оказалось, что относительные спектральные изменения, обусловленные связыванием сукцината, в точности соответствуют относительным изменениям коэффициента седиментации каталитического тримера. Это означает, что связывание сукцината и конформационные изменения являются параллельно протекающими процессами.

Если в нативном ферменте пронитровать только каталитические цепи, то образующийся модифицированный фермент по своим каталитическим свойствам подобен немодифицированному белку. Итак, введение нитрогруппы в К-цепи как изолированных тримеров, так и нативного фермента не вызывает серьезных изменений свойств. Более того, при насыщении фермента сукцинатом изменения оптической плотности при 430 нм в расчете на одну К-цепь почти одинаковы для нативного фермента и для изолированных каталитических тримеров.

Тем не менее вид зависимостей относительных спектральных изменений от концентрации субстрата совершенно различен для изолированных каталитических тримеров и для интактного фермента. На рис. 17.11 сравнивается гиперболическая кривая связывания сукцината с тримерами и сигмоидная кривая кооперативного связывания с интактными молекулами. Как видно на рисунке, кооперативность присуща только интактным молекулам и для ее возникновения необходимо присутствие R-цепей.

Если сопоставить кривые зависимостей относительных спектральных изменений и относительных седиментационных изменений от концентрации сукцината для интактного фермента (рис. 17.12), то можно видеть, что конформационные изменения, выявляемые по седиментационным данным, опережают спектральные изменения, обусловленные связыванием сукцината. Именно такая взаимосвязь двух процессов предсказывается моделью МУШ.



РИС. 17.11. Относительные спектральные изменения (при 430 нм) как функция концентрации сукцината для подвергнутых нитрованию каталитических субъединиц и АКТаза. (Kirschner M. W., Schachman H. K., Biochemistry, 12, 2997, 1973.)



РИС. 17.12. Седиментационные и спектральные (при 430 нм) изменения для подвергнутой нитрованию АКТазы. (Kirschner M. W., Schachman H. K., Biochemistry, 12, 2997, 1973.)

Итак, с помощью этой модели можно объяснить не только некоторые экспериментальные данные по кинетике. Ключевое предсказание модели о взаимосвязи между конформационными изменениями и степенью насыщения фермента субстратом подтверждается прямыми экспериментальными фактами, демонстрирующими существование конформационных изменений.

17.5. Альтернативные модели для аллостерических белков

Хотя с помощью модели МУШ можно объяснить многие опытные факты для АКТазы и других ферментов, совершенно очевидно, что она не способна объяснить свойства всех систем. Более того, хотя основные особенности АКТазы согласуются с предсказаниями модели, она не может объяснить все экспериментальные данные, которые были получены для этого фермента.

Одно из наиболее очевидных ограничений модели МУШ — это неспособность объяснить явление *антикооперативности*. В этой модели лиганд всегда смещает конформационное равновесие в сторону формы, с которой он преимущественно связывается. В результате происходит лишь усиление дальнейшего связывания такого же лиганда и ни при каких условиях не реализуется ситуация, при которой связывание ослаблялось бы по мере развития процесса насыщения.

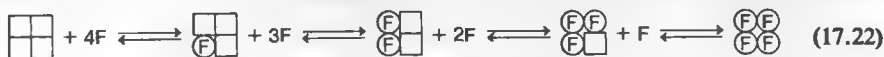
При связывании лигандов действительно наблюдалась антикооперативность, хотя при этом не ясно, является ли эта антикооперативность истинной или за наблюдаемую антикооперативность ответственны какие-либо другие эффекты (Gennis, 1976). Тем не менее очевидно, что для разумного объяснения истинной антикооперативной системы необходимо пользоваться не моделью МУШ, а какой-то другой.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ

Из-за ограничений модели МУШ иногда экспериментальные данные интерпретируют в рамках *последовательной модели*. Эта модель детально разработана Кошландом и сотр. (Koshland et al., 1966). Существенной особенностью модели является предположение о том, что связывание лиганда вызывает ряд последовательных структурных изменений в белке, и, таким образом, реализуется несколько промежуточных конформационных состояний. На молекулу не налагается ограничений относительно симметричности состояний, поэтому возможно существование многих конформаций. В принципе любое данное конформационное состояние может иметь собственные уникальные значения микроскопических констант диссоциации, которые характеризуют места связывания лигандов. По

мере того как белок связывает лиганд и происходит его переход из одного структурного состояния в другое, последовательные значения константы диссоциации могут увеличиваться или уменьшаться. По этой причине может быть реализовано связывание фактически любого типа, в том числе антикооперативное.

Простейшей является следующая схема последовательных структурных изменений:



В этом примере предполагается, что при связывании лиганда каждая субъединица переходит из одной конформации в другую. Согласно схеме (17.22), лиганд *индуцирует* конформационную перестройку в той субъединице, с которой он связывается. Конформационное изменение, в частности, может происходить для того, чтобы обеспечить лучшее структурное соответствие между лигандом и местом связывания. В результате конформационного перехода в данной субъединице взаимодействие между субъединицами может измениться таким образом, что изменится также сродство к лиганду соседних субъединиц, имеющих вакантные места связывания.

Более того, в несимметричном промежуточном состоянии, таком, как



взаимодействие данной субъединицы с другими субъединицами может быть уникальным для каждой субъединицы. Благодаря этим различиям во взаимодействиях в промежуточном конформационном состоянии константы диссоциации лиганда для каждого из свободных мест связывания могут иметь разные значения. Все это позволяет объяснить большое разнообразие экспериментальных данных.

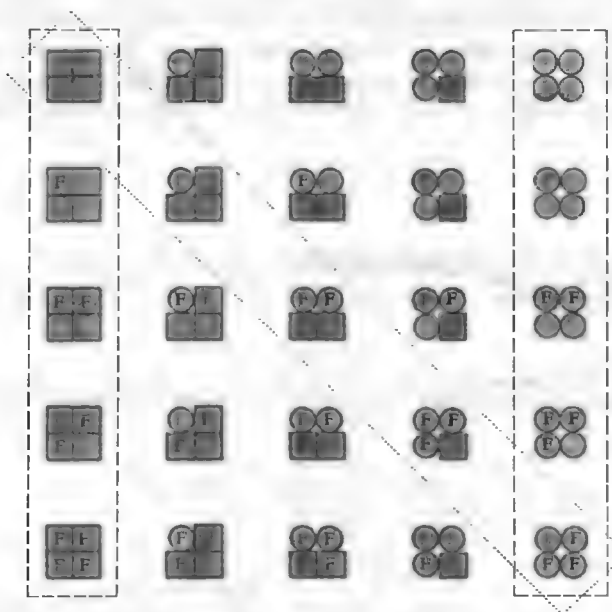


РИС. 17.13. Общая аллостерическая схема (объяснения см. в тексте; Hammes G. G., Wu C. -W., Science, 172, 1205, 1971.)

БОЛЕЕ ОБЩАЯ СХЕМА

На рис. 17.13 показана более общая схема аллостерических взаимодействий. В этой схеме допускается, что отдельные субъединицы могут находиться в одном из двух конформационных состояний независимо от числа связанных лигандов. Для четырехсубъединичного белка возможны 25 различных форм. Можно видеть, что модель МУШ является предельным случаем этой схемы: она включает в себя только состояния, которые ограничены прямоугольниками, нарисованными прерывистой линией. Простейшая последовательная модель включает в себя состояния, ограниченные диагональным пунктирным прямоугольником.

Можно представить себе еще более сложные схемы, включающие в себя большее число конформационных состояний субъединиц, чем схемы, представленные уравнением (17.22) и рис. 17.13. Естественно, наиболее привлекательна простейшая схема, которая описывала бы все экспериментальные факты. По этой причине данные для аллостерических белков часто интерпретируются в рамках модели МУШ, так как в ней содержится всего лишь несколько параметров. Однако, если результаты эксперимента нельзя объяснить в рамках модели МУШ, необходимо обратиться к схемам, которые содержат в себе большее число варьируемых параметров, например к простейшей последовательной модели [уравнение (17.22)].

17.6. Гемоглобин

В качестве еще одного примера хорошо изученного аллостерического белка мы рассмотрим гемоглобин и кратко проанализируем некоторые основные особенности его как аллостерической системы. Ряд структурных и функциональных аспектов для гемоглобина в сжатой форме изложены в гл. 2. Молекула гемоглобина состоит из четырех полипептидных цепей, двух α -цепей и двух β -цепей, которые образуют тетрамерную структуру $\alpha_2\beta_2$. В структурном отношении α - и β -цепи очень сходны, каждая состоит примерно из 150 аминокислотных остатков и содержит один гем с двухвалентным атомом железа Fe^{2+} . Тетрамерный белок обратимо связывается с четырьмя молекулами кислорода.

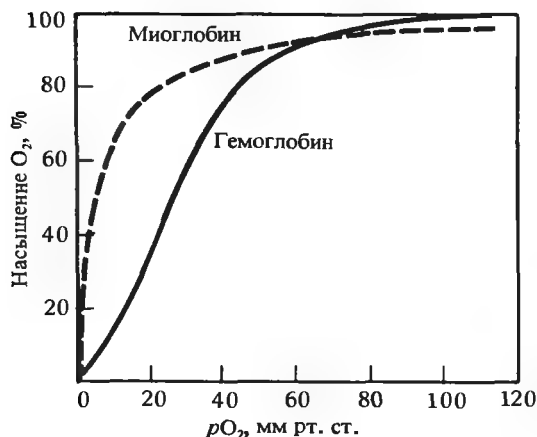


РИС. 17.14. Кривые оксигенации гемоглобина и миоглобина при pH 7,4 и 38°C. (Daniels F., Alberty R. A., Physical Chemistry, 4th ed., New York, Wiley, 1975.)

КООПЕРАТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ КИСЛОРОДА

На рис. 17.14 сравниваются кривые оксигенации (связывания кислорода) для гемоглобина и миоглобина. Молекула миоглобина состоит из одной цепи, подобной отдельной цепи гемоглобина, и содержит только одну группу гема. Как следует из вида кривых, миоглобин имеет нормальную зависимость, присущую взаимодействию лиганда с единственным местом связывания, а гемоглобин характеризуется кооперативным связыванием кислорода. По мере увеличения давления кислорода 30%-ное насыщение миоглобина наступает раньше, чем достигается какое-либо значительное связывание с кислородом гемоглобина. Вместе с тем в результате резкого последующего подъема кривой для гемоглобина при 90%-ном насыщении две кривые оксигенации пересекаются.

Резкая зависимость относительного насыщения гемоглобина от давления кислорода имеет важное физиологическое значение. Ее следствием является способность молекулы реагировать на малые изменения давления кислорода с освобождением или присоединением значительных количеств кислорода.

АНАЛИЗ РАВНОВЕСИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА: СХЕМА ЭДЕРА

Оксигенацию гемоглобина можно описать с помощью той или другой из аллостерических моделей, таких, как модель МУШ, последовательная модель или схемы, которые включают в себя черты обеих моделей. Однако не будет лишним остановиться на простом феноменологическом описании явления, впервые примененным Эдером в 1925 г. Хотя при феноменологическом описании теряется смысл некоторых параметров, фигурирующих в детально разработанных моделях, оно имеет то преимущество, что позволяет дать простое и ясное представление о системе.

Связывание кислорода можно описать с помощью четырех реакций равновесия:



где H_i представляет собой продукт взаимодействия гемоглобина с i молекулами кислорода. Каждую из стадий реакции можно охарактеризовать макроскопической константой диссоциации K_j :

$$K_j = (H_{j-1})pO_2/(H_j) \quad (17.24)$$

где pO_2 — парциальное давление кислорода. Тогда для степени насыщения y имеем

$$\bar{y} = \sum_{i=0}^4 i(H_i) / \left(4 \sum_{i=0}^4 (H_i) \right) \quad (17.25a)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^4 \left(i(pO_2)^i \prod_{j=1}^i (1/K_j) \right)}{4 \left[1 + \sum_{i=1}^4 \left((pO_2)^i \prod_{j=1}^i (1/K_j) \right) \right]} \quad (17.25б)$$

Уравнение (17.25б) следует из уравнения (17.25а), если подставить в него константы равновесия, даваемые уравнением (17.24). Макроскопические константы K_j можно выразить через микроскопические константы k_j , где k_j определяется как константа диссоциации одной молекулы O_2 для любого из микросостояний, в котором молекула белка содержит j молекул связанного кислорода. Таким образом, величины k_j считаются идентичными для всех микросостояний, в которых молекулы белка имеют j связанных молекул кислорода. Связь между K_j и k_j выражается уравнением, аналогичным уравнению (15.20):

$$K_j = (\Omega_{nj-1}/\Omega_{nj})k_j \quad (17.26)$$

где $n = 4$ и Ω_j дается уравнением (15.14). Например, если $j = 2$, то мы получаем $K_j = 2k_j/3$. Подставляя уравнение (17.26) в уравнение (17.25б), находим

$$\bar{y} = \frac{(pO_2/k_1) + [3(pO_2)^2/k_1k_2] + [3(pO_2)^3/k_1k_2k_3] + [(pO_2)^4/k_1k_2k_3k_4]}{1 + (4pO_2/k_1) + [6(pO_2)^2/k_1k_2] + [4(pO_2)^3/k_1k_2k_3] + [(pO_2)^4/k_1k_2k_3k_4]} \quad (17.27)$$

ОЦЕНКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ КОНСТАНТ СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА

Точные измерения $\bar{y}$ при большом числе значений pO_2 позволяют с помощью уравнения (17.27) получить оценки величин параметров k_j . В табл. 17.1 перечислены некоторые экспериментальные значения k_j , полученные при $25^\circ C$ в растворе при pH 7,4 в отсутствие и в присутствии 0,1 M NaCl. В отсутствие соли заметно постепенное уменьшение k_j по мере оксигенации; наибольшее изменение имеет место между величинами k_2 и k_3 . Видно, что последняя молекула кислорода связывается более чем в 30 раз прочнее, чем первая.

Если добавить в раствор 0,1 M NaCl, то величины всех k_j , кроме k_4 , существенно возрастают; при этом кривая оксигенации смещается вправо. Как мы увидим, этот сдвиг можно объяснить стабилизацией анионами дезоксиформы и частично оксигенированных молекул гемоглобина. Отметим также почти 300-кратное различие между значениями k_1 и k_4 , которое означает огромное увеличение сродства к O_2 последней молекулы по сравнению с первой.

Таблица 17.1

ЗНАЧЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ КОНСТАНТ
ДИССОЦИАЦИИ ДЛЯ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА ¹⁾, ²⁾

	k_1	k_2	k_3	k_4
— NaCl	8,8	6,1	0,85	0,25
+ 0,1 M NaCl	42	13	12	0,14

¹⁾ Значения k даны в единицах мм рт. ст. Эти значения были найдены для раствора белка в 10 mM трис-буфере, pH 7,4 при $25^\circ C$.

²⁾ Данные из работы Tzuma I., Imai K., Shimizu K., Biochemistry, 12, 1491, 1973.

КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В ПРОЦЕССЕ ОКСИГЕНАЦИИ

Значения k_j полезны для вычисления концентраций молекул H_j с разной степенью оксигенации. На рис. 17.15 показаны зависимости концентраций H_j от pO_2 для случая, когда

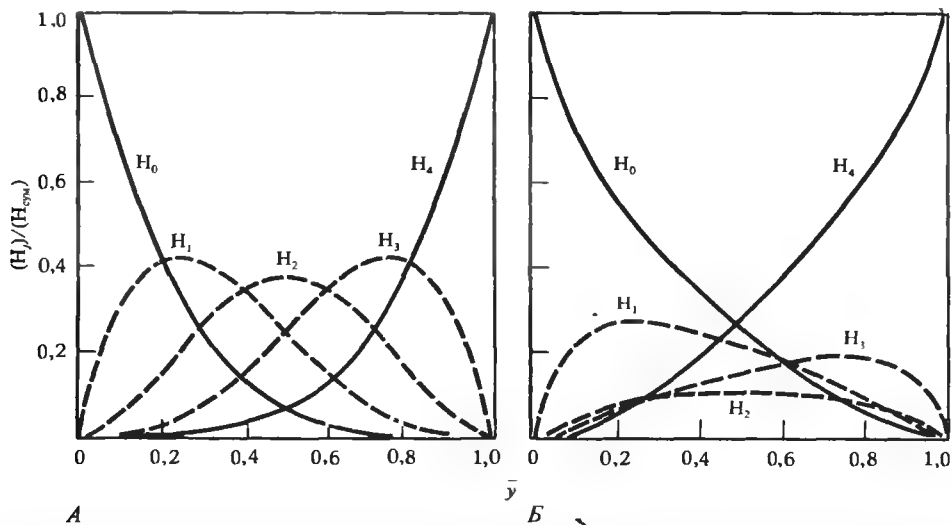


РИС. 17.15. Доля молекул гемоглобина в состоянии H_j как функция y ($H_{\text{сум}}$ — суммарная концентрация гемоглобина). А. Значения всех k_j равны. Б. Значения k_j в отсутствие NaCl приведены в табл. 17.1. (Tyuma I., Imai K., Shimizu K., Biochemistry, 12, 1491, 1973.)

значения всех k_j равны (рис. 17.15, А), и для значений k_j (в отсутствие NaCl), перечисленных в табл. 17.1 (рис. 17.15, Б). Этот рисунок иллюстрирует физическое следствие кооперативности. Когда все значения k_j равны, максимальные концентрации всех промежуточных форм H_1 , H_2 и H_3 достигают в некоторой точке титрования 40% суммарной концентрации гемоглобина. В отличие от этого случая в реальной системе, где значения k_j уменьшаются с ростом j , концентрации этих промежуточных форм понижены. Кроме того, концентрация H_4 возрастает на рис. 17.15, Б гораздо быстрее, чем на рис. 17.15, А. Например, при $y = 0,5$ концентрация H_4 составляет лишь несколько процентов суммарной концентрации гемоглобина на рис. 17.15, А и достигает 30% этой величины на рис. 17.15, Б. Таким образом, за кооперативное связывание кислорода гемоглобином в основном ответственно равновесие между H_0 и H_4 .

КОНСТАНТА ХИЛЛА И ЭНЕРГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМ — ГЕМ

Если описывать кривую оксигенации с помощью уравнения (17.27), становится очевидным, что равновесие при связывании кислорода гемоглобином не подчиняется простым выражениям (15.43) и (15.45). Это означает, что константа Хилла, определяемая уравнением (15.46), изменяется с изменением степени оксигенации. На рис. 17.16 приведена зависимость α от pO_2 для очищенного от органических фосфатов гемоглобина (см. ниже) в буферном растворе низкой ионной силы. Значения α были вычислены с помощью уравнения (15.46). По мере увеличения степени оксигенации константа Хилла вначале растет, а затем уменьшается, т.е. эта зависимость изображается колоколообразной кривой. Максимальное значение $\alpha = 2,5$ достигается примерно при $y = 0,5$. Таким образом, в наибольшей степени кооперативность реализуется в средней области кривой насыщения.

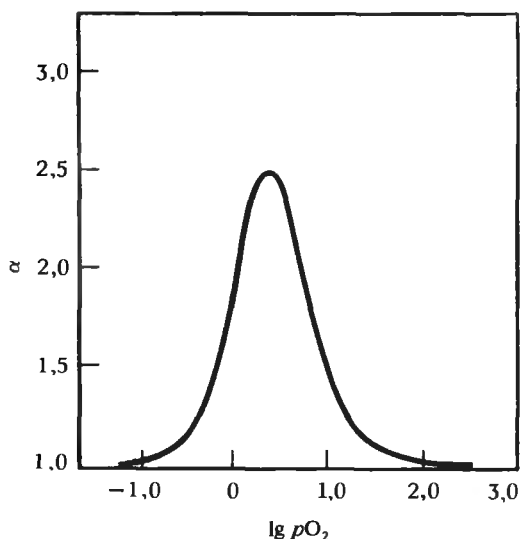


РИС. 17.16. Зависимость α от $\lg pO_2$ для очищенного от фосфатов гемоглобина. (Tuyama I., Imai K., Shimizu K., Biochemistry, 12, 1491, 1973.)

Интересно оценить величину энергии взаимодействия между местами связывания i и j , которая ответственна за кооперативные эффекты. Именно это мы проделали в гл. 15 сразу после обсуждения уравнения (15.39) для $i = 1$ и $j = 4$. (В действительности в данном случае мы сравниваем сродство вакантного места связывания, когда все остальные места связывания заняты, со сродством, когда все остальные места связывания вакантны.) Используя данные табл. 17.1, можно вычислить, что свободная энергия взаимодействия $\Delta G_{1,ij}$ в отсутствие NaCl равна $-2,1$ ккал·моль $^{-1}$ ·гем $^{-1}$. Таким образом, для всей молекулы с четырьмя местами связывания суммарная энергия взаимодействия составляет около $-8,4$ ккал·моль $^{-1}$ (25°C).

ЭФФЕКТ БОРА

Связывание кислорода с гемоглобином сильно зависит от pH. На рис. 17.17 показаны кривые насыщения кислородом (в процентах) как функция pO_2 при трех значениях pH. При $pH < 7,6$ кривая оксигенации сдвигается вправо. Благодаря этому сдвигу гемоглобин способен освобождать большее количество кислорода в периферийных областях, где в эритроцитах накапливается угольная кислота (из CO_2 , выделяемого в процессе дыхания в тканях).

Очевидно, что между ассоциацией кислорода и взаимодействием ионов водорода с соответствующими областями на молекуле гемоглобина существует взаимосвязь. Эта обратная взаимосвязь известна как *эффект Бора*. Он возникает из-за различий в значениях pK определенных аминокислотных остатков в дезоксигемоглобине и оксигемоглобине.

Чтобы проанализировать эффект Бора более детально, мы воспользуемся соотношением (15.70) и примем, что $L_1 = H^+$ и $L_2 = O_2$. В результате мы имеем

$$\left(\frac{\partial (\ln pO_2)}{\partial [\ln(H^+)]} \right)_{\bar{y}_{O_2}} = -\frac{n}{m} \left(\frac{\partial \bar{y}_{H^+}}{\partial \bar{y}_{O_2}} \right)_{(H^+)} \quad (17.28)$$

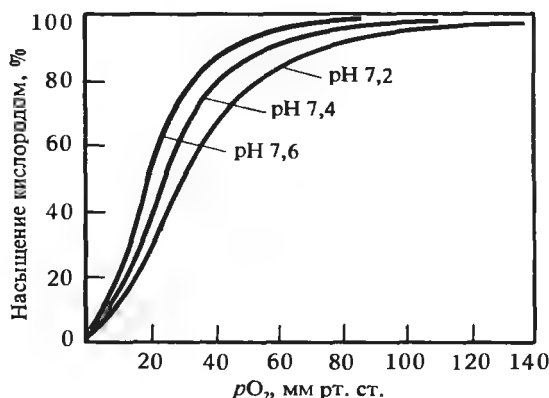


РИС. 17.17. Эффект Бора: влияние pH на кривую оксигенации гемоглобина. (Benesch R. E., Benesch R., Adv. Protein Chem., 28, 211, 1974.)

где предполагается взаимосвязь между связыванием n протонов и $m (= 4)$ молекул кислорода. Необходимо отметить также то, что степень насыщения y_{H^+} тоже относится только к тем протонам, которые чувствительны к оксигенации (а не ко всем протонам, которые могут быть связаны с белком). Экспериментально показано, что сдвиг кривой оксигенации при изменении pH не сопровождается заметным изменением формы кривой. Однако величина сдвига зависит от pH. Сказанное означает, что производная в левой части уравнения (17.28) не зависит от y_{O_2} , а зависит только от pH (при данной температуре). Производную обычно оценивают при значении $y_{O_2} = 1/2$. Принимая во внимание сказанное, а также то, что $\ln(H^+) = -2,3 \cdot pH$, уравнение (17.28) можно переписать в виде

$$\left(\frac{\partial [\log(pO_2)_{1/2}]}{\partial (pH)} \right)_{y_{O_2} = 1/2} = \frac{n}{m} \left(\frac{\partial y_{H^+}}{\partial y_{O_2}} \right)_{pH} \quad (17.29)$$

где $(pO_2)_{1/2}$ — значение pO_2 , соответствующее полунасыщению. Правая часть уравнения (17.29) не что иное, как изменение числа молей связанных H^+ при присоединении к белку моля O_2 . Используя обычно применяемые в литературе обозначения, мы перепишем уравнение (17.29):

$$\left(\frac{\partial [\log(pO_2)_{1/2}]}{\partial (pH)} \right)_{y_{O_2} = 1/2} = -\Delta \bar{H}^+ \quad (17.30)$$

где $\Delta \bar{H}^+ = H^+_{\text{дезокс}} - \bar{H}^+_{\text{окси}}$ представляет собой разность числа связанных H^+ в расчете на гем для дезокси- и оксиформ.

Величину $\Delta \bar{H}^+$ можно получить из данных по титрованию и сравнить ее с величиной, вычисленной из наблюдаемого изменения $\lg(pO_2)_{1/2}$ при изменении pH. Возможны два типа титрования. В одном из них измеряют изменение pH, соответствующее полной оксигенации дезоксигемоглобина. Затем с помощью этого изменения и кривой титрования оксигемоглобина определяют число молей H^+ , которое освобождается или поглощается в процессе оксигенации дезоксигемоглобина при фиксированном pH исходного раствора. Второй метод заключается в том, чтобы полностью оксигенировать дезоксигемоглобин и затем титровать раствор (добавляя кислоту или основание) до восстановления первоначальной величины pH (до оксигенации); этим способом получают непосредственно величину $\Delta \bar{H}^+$.

Результаты титрования при 30°C показаны на рис. 17.18. На нем приведены значения $\Delta \bar{H}^+$ в интервале pH от ~5 до ~9. Из рисунка видно, что при pH > 6 величина $\Delta \bar{H}^+$ по-

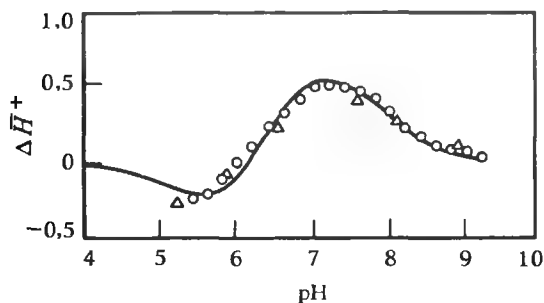


РИС. 17.18. Влияние pH на ΔH^+ для гемоглобина человека при 30°C. Кривая вычислена с помощью значений констант, приведенных в табл. 17.2. Точки соответствуют двум разным способам измерения. (Antonini E. et al., J. Biol. Chem., **240**, 1096, 1965.)

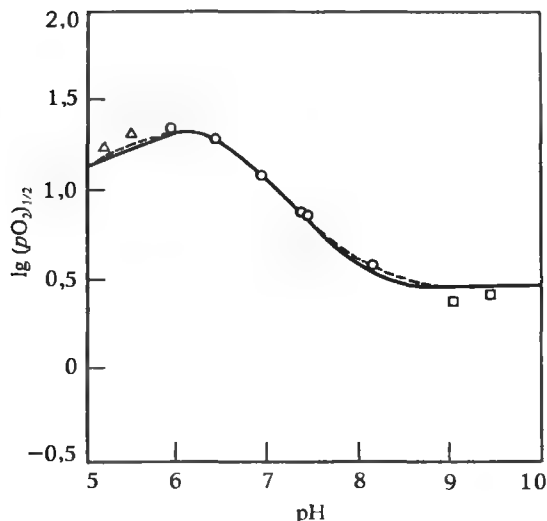


РИС. 17.19. Эффект Бора для гемоглобина человека при 30°C. Точки соответствуют экспериментальным значениям $\lg(pO_2)_{1/2}$, полученным из кривых оксигенации, которые были измерены для трех буферных систем. Для сплошной линии были использованы значения констант, указанных в табл. 17.2. Пунктирная линия соответствует графическому интегрированию данных на рис. 17.18. (Antonini E. et al., J. Biol. Chem., **240**, 1096, 1965.)

ложительна, т.е. при оксигенации в этой области pH протоны освобождаются. При $\sim$ pH 7,2 достигается максимальное значение, равное около 0,5 моль освобождаемых H^+ на моль связанных молекул кислорода.

Уравнение (17.30) можно проинтегрировать и найти соотношение между $\lg(pO_2)_{1/2}$ и pH при произвольной константе интегрирования. Для численного интегрирования используем данные рис. 17.18. Найденное таким способом соотношение между $\lg(pO_2)_{1/2}$ и pH (основанное на данных по титрованию) затем сравним с прямыми независимыми измерениями зависимости $\lg(pO_2)_{1/2}$ от pH.

На рис. 17.19 показано такое сравнение. Штриховая кривая была получена по данным титрования на рис. 17.18 после их численного интегрирования. Точками обозначена непосредственно измеренная зависимость $\lg(pO_2)_{1/2}$ от pH. Почти абсолютное совпадение двух кривых подтверждает справедливость уравнения (17.30).

Необходимо отметить, что если бы какой-либо другой ион связывался преимущественно с одной из форм гемоглобина, присутствие этого иона в достаточном количестве могло бы существенно повлиять на совпадение кривых, получаемых двумя способами. Например, такое влияние могли бы оказать ионы буфера, в котором измеряется оксигенация, или органические фосфаты (дифосфоглицерат). Органические фосфаты связываются

гораздо сильнее с дезоксигемоглобином и это связывание зависит от pH. В присутствии такой третьей компоненты прямое использование уравнения (17.30) безусловно некорректно, поскольку при его использовании предполагается существование только двух связанных компонент.

ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЙ рК ДЛЯ ЗАВИСЯЩИХ ОТ КИСЛОРОДА ПРОЦЕССОВ ИОНИЗАЦИИ

Данными на рис. 17.18 можно воспользоваться для оценки величин рК ионизируемых групп, чувствительных к оксигенации. Для того чтобы интерпретировать данные, обычно бывает достаточно предположить существование двух ионизируемых групп. Мы обозначим микроскопические константы для этих групп в дезоксигемоглобине через k'_1 и k'_2 и соответствующие константы для оксигемоглобина через k''_1 и k''_2 . Для оценки среднего числа молей связанных «боровских» протонов на гем в дезоксигемоглобине ($\bar{H}^+_{\text{дезокси}}$) и в оксигемоглобине ($\bar{H}^+_{\text{окси}}$) мы обратимся к соотношениям, которые были выведены в гл. 15. Пусть M^j ($j = 4$) и $M^{(0)}$ в уравнениях (15.77) и (15.78) относятся к оксигемоглобину и к дезоксигемоглобину соответственно. Тогда из уравнений (15.52) — (15.54) [см. также уравнения (15.77) — (15.81)] имеем

$$\bar{H}^+_{\text{дезокси}} = \frac{d\{\ln[1 + (H^+)/k'_1][1 + (H^+)/k'_2]\}}{d[\ln(H^+)]} \quad (17.31a)$$

$$= \{(H^+)/[k'_1 + (H^+)]\} + (H^+)/[k'_2 + (H^+)] \quad (17.31b)$$

$$\bar{H}^+_{\text{окси}} = \frac{d\{\ln[1 + (H^+)/k''_1][1 + (H^+)/k''_2]\}}{d[\ln(H^+)]} \quad (17.32a)$$

$$= \{(H^+)/[k''_1 + (H^+)]\} + (H^+)/[k''_2 + (H^+)] \quad (17.32b)$$

$$\text{и} \quad \Delta\bar{H}^+ = \bar{H}^+_{\text{дезокси}} - \bar{H}^+_{\text{окси}} \quad (17.33)$$

Уравнения (17.31) и (17.32) можно также вывести непосредственно из выражений для констант ионизации, не обращаясь к уравнениям (15.52) — (15.54) или (15.77) — (15.81).

В табл. 17.2 даны значения четырех рК для гемоглобина человека, найденные из данных на рис. 17.18. Обратите внимание, что при оксигенации значение pK'_1 сдвигается в сторону больших значений на 0,8 единиц, а значение pK'_2 — в сторону меньших значений на 1,4 единицы. Большой сдвиг pK'_2 к меньшим значениям ответствен за освобождение протонов, когда гемоглобин оксигенируется при $\text{pH} > 6$. При $\text{pH} < 6$ доминируют эффекты от изменения pK'_1 к более высоким значениям при оксигенации, поэтому в итоге происходит присоединение протонов. Эффекты от сдвига двух рК компенсируют друг друга в области pH 6, где $\Delta\bar{H}^+ = 0$.

На основании данных по теплотам ионизации и некоторых других было высказано предположение о том, что основной боровской группой (с pK'_2) является гистидин, а кислотной группой (с pK'_1) — карбоксил. Согласно кристаллографическим данным, за ионизацию с pK'_2 могут быть ответственны С-концевой гистидин в β -цепи и N-концевая аминокислота в α -цепи. За ионизацию с pK'_1 могут быть ответственны С-концевые карбоксилы (и, возможно, внутренний остаток аспарагиновой кислоты). Участие гистидина β -цепи и С-концевых карбоксильных групп в эффекте Бора было установлено также с помощью химических методов.

Таблица 17.2

ЗНАЧЕНИЯ pK ДЛЯ ЗАВИСЯЩИХ ОТ
КИСЛОРОДА ИОНИЗУЕМЫХ ГРУПП
В ГЕМОГЛОБИНЕ ЧЕЛОВЕКА^{1), 2)}

pK'_1 (дезокс)	pK'_1 (окси)	pK'_2 (дезокс)	pK'_2 (окси)
5,5	6,3	7,6	6,2

¹⁾ Значения pK определяли при 30°C.

²⁾ Данные из работы Antonini et al., J. Biol. Chem, **240**, 1096, 1965.

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ НА КРИВУЮ ОКСИГЕНАЦИИ

Соли и особенно органические фосфаты оказывают сильное влияние на кривую оксигенации гемоглобина. Этот эффект был открыт Рейнольдсом и Рутон Бенешами (1967) и Чанутином и Курнишем (1967). Бенеша изучали это явление в течение многих лет.

На рис. 17.20 показаны кривые оксигенации при 30°C для целой крови и для гемоглобина в 10 mM NaCl, свободном от органических фосфатов (иногда называемого "stripped"-гемоглобином). Хотя кооперативные эффекты для целой крови и сохраняются, ее кривая оксигенации сильно смещена вправо. Компонентом крови, который наиболее сильно влияет на равновесие при связывании кислорода гемоглобином, является 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ):

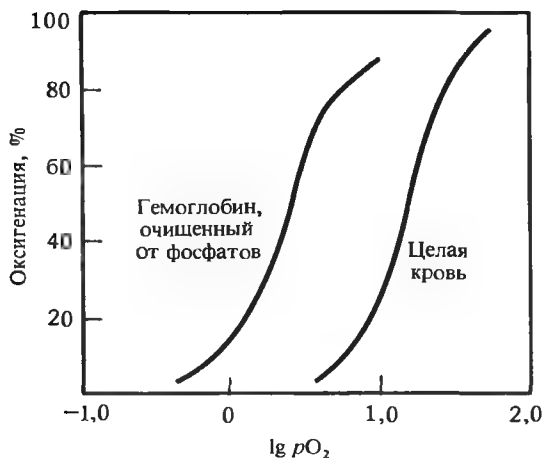
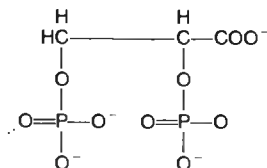


РИС. 17.20. Сравнение кривых оксигенации для очищенного от фосфатов гемоглобина и целой крови. (Benesch R. E., Benesch R., Adv. Protein Chem., **28**, 211, 1974.)

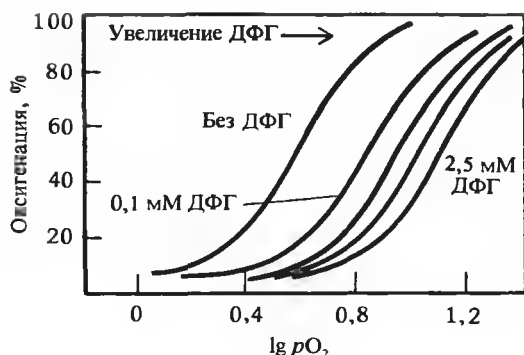


РИС. 17.21. Влияние ДФГ на кривые оксигенации гемоглобина. (Benesch R. E. et al., Nature New Biol., **234**, 174, 1971.)

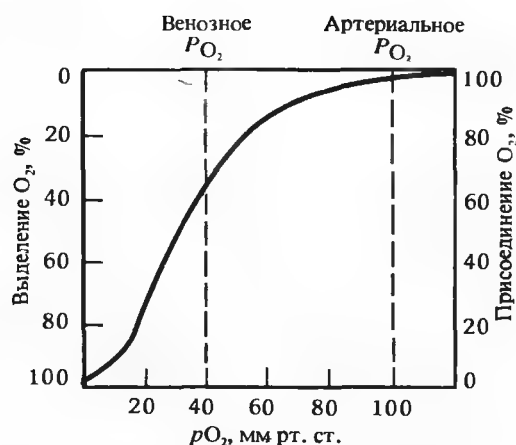


РИС. 17.22. Связь между кривой оксигенации крови и венозным и артериальным давлением кислорода. (Benesch R. E., Benesch R., Adv. Protein Chem., **28**, 211, 1974.)

На рис. 17.21 показано влияние малых концентраций ДФГ на кривую оксигенации. Видно, что даже при таких низких концентрациях, как 10^{-4} М, ДФГ заметно смещает кривую оксигенации, которая при увеличении количеств ДФГ смещается в сторону более высоких давлений кислорода.

Эффект ДФГ при низких концентрациях обусловлен его сильным и преимущественным связыванием с дезоксигемоглобином. Константа диссоциации ДФГ для дезоксигемоглобина имеет величину около 15 мкМ. Именно благодаря заметному преимущественному связыванию с дезоксиформой ДФГ оказывает такое сильное влияние на смещение равновесия связывания кислорода в сторону дезоксисостояния. В эритроцитах эффект особенно велик, потому что внутриклеточная концентрация ДФГ равна около 4 мМ, т.е. намного превышает величину константы диссоциации.

На рис. 17.22 приведена кривая оксигенации для целой крови и указаны значения парциальных давлений кислорода в венозной и артериальной крови. При артериальном давлении кислорода гемоглобин практически полностью насыщен кислородом, а при венозном давлении степень насыщения составляет около 60%. Следовательно, около 40% кислорода освобождается в тканях. Поскольку в отсутствие ДФГ кривая оксигенации сильно смещена влево (ср. рис. 17.20 и 17.21), очевидно, без ДФГ (или его аналогов) при венозном давлении кислорода может освободиться лишь небольшое количество кислорода. Следу-

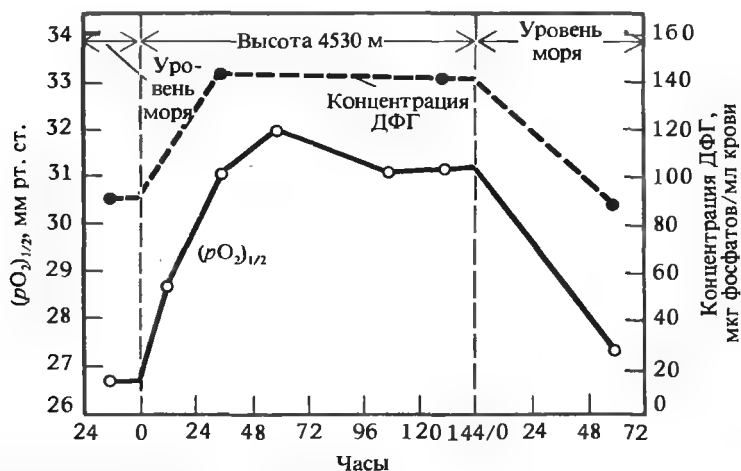


РИС. 17.23. Влияние пребывания на большой высоте на сродство крови к кислороду и на концентрацию ДФГ. (Lenfant C. et al., J. Clin. Invest., 47, 2652, 1968.)

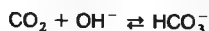
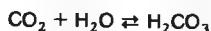
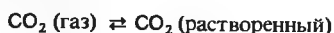
ет добавить, однако, что внутриклеточная концентрация ДФГ подвержена регуляции. Это создает возможность для организма адаптироваться к условиям обитания путем сдвига кривой оксигенации.

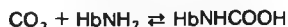
Влияние большой высоты на сродство к кислороду может служить примером того, как изменение уровня ДФГ способствует адаптации. На рис. 17.23 даны зависимости парциального давления кислорода при полунасыщении $(pO_2)_{1/2}$ от времени пребывания организма на большой высоте и от времени пребывания при давлении кислорода на уровне моря. На рисунке показано также изменение концентрации ДФГ в эритроцитах. Можно видеть, что при перемещении с уровня моря на большую высоту происходит резкое увеличение концентрации ДФГ и сопутствующее этому увеличение $(pO_2)_{1/2}$ до тех пор, пока не установятся новые стационарные значения для каждого из этих параметров. Сдвиг кривой оксигенации вправо на большой высоте позволяет гемоглобину высвобождать в тканях большее количество кислорода, чем в том случае, если бы такого сдвига не было. Наоборот, с возвращением на уровень моря концентрация ДФГ и величина $(pO_2)_{1/2}$ уменьшаются до их прежних значений.

17.7. Взаимодействие двуокиси углерода с гемоглобином

Еще с начала XX века известно, что CO_2 взаимодействует с гемоглобином. В частности, оказалось, что CO_2 значительно влияет на кривую оксигенации, сдвигая ее вправо. Хотя это явление было обнаружено много лет назад, только недавно удалось его понять.

Рассмотрим следующие равновесия:





В этих уравнениях первое равновесие относится к растворению CO_2 , все последующие стадии превращений с CO_2 , как считается, включают в себя растворенные формы. HbNH_2 означает аминогруппу гемоглобина (Hb), которая реагирует с CO_2 с образованием карбамата.

Килмартин и Росси-Бернарди (Kilmartin, Rossi-Bernardi, 1973) идентифицировали эти реакционноспособные аминогруппы. Они приготовили тетрамеры гемоглобина, у которых различные N-концевые α -аминогруппы были блокированы цианатом. Среди этих тетрамеров были те, у которых все четыре α -аминогруппы прореагировали с цианатом, тетрамеры, у которых были блокированы только аминогруппы β -цепей, и, наконец, тетрамеры с блокированными N-концевыми аминогруппами только в α -цепях. Оказалось, что CO_2 не влияет на кривую оксигенации молекул, у которых блокированы все четыре группы. Вместе с тем у молекул только с двумя блокированными N-концевыми группами влияние CO_2 на кривую оксигенации было уменьшено вдвое по сравнению с эффектом для нативного немодифицированного гемоглобина. Таким образом, было установлено, что концевые аминогруппы являются местами связывания молекул CO_2 . С дезоксиформой гемоглобина молекулы CO_2 связываются прочнее, чем с оксиформой.

ДФГ взаимодействует с N-концевыми α -аминогруппами β -цепей (см. ниже). Поэтому можно ожидать, что молекулы ДФГ и CO_2 конкурируют за связывание с гемоглобином, и

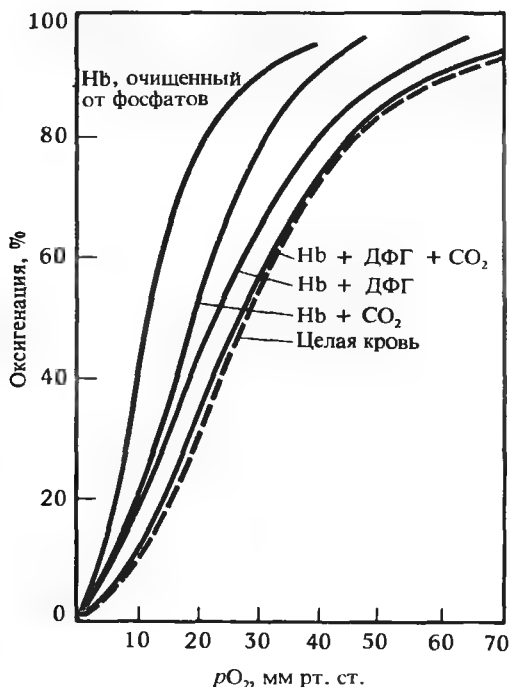


РИС. 17.24. Влияние ДФГ и CO_2 (по отдельности и совместно) на кривую оксигенации гемоглобина. (Kilmartin J. V., Rossi-Bernardi L., *Physiol. Rev.*, 53, 836, 1973.)

это действительно было подтверждено экспериментально. Конечно, α -аминогруппы α -цепей могут реагировать с CO_2 даже в присутствии ДФГ.

Итак, регуляторами сродства гемоглобина к кислороду являются как молекулы ДФГ, так и молекулы CO_2 . На рис. 17.24 показаны кривые оксигенации для целой крови, для очищенного от фосфатов гемоглобина и для очищенного от фосфатов гемоглобина в присутствии ДФГ и CO_2 . Видно, что наибольший сдвиг кривой оксигенации происходит при одновременном присутствии CO_2 и ДФГ и что эта кривая почти совпадает с кривой, описывающей соответствующую зависимость для целой крови при тех же условиях. Следовательно, если мы хотим объяснить кривую связывания кислорода целой кровью, необходимо учитывать эффекты как CO_2 , так и ДФГ.

Помимо этого реакция CO_2 с гемоглобином обеспечивает транспорт CO_2 кровью. После освобождения кислорода в тканях дезоксигемоглобин может связаться с образовавшимися в них молекулами CO_2 и транспортировать их к легким, через которые CO_2 в конечном счете покидает организм. Количество CO_2 , транспортируемое в реакции с гемоглобином, составляет от 10 до 15% общего количества переносимого CO_2 .

17.8. Связь между структурой и механизмом функционирования гемоглобина

В последние годы был достигнут значительный прогресс в определении молекулярной структуры гемоглобина в кристаллах и в установлении связи между структурой и совокупностью различных экспериментальных фактов.

Кристаллографическими исследованиями этого белка руководил Макс Перутц. Была определена структура дезоксигемоглобина и ферригемоглобина. Считается, что структура последнего изоморфна структуре оксигемоглобина, который содержит связанную с Fe^{2+} молекулу O_2 . Однако оксиформа быстро окисляется, и поэтому ее трудно исследовать. В обеих формах взаимное расположение субъединиц характеризуется осью симметрии второго порядка. Структура каждой субъединицы подобна структуре миоглобина. Имеется восемь спиральных сегментов, которые уложены специфическим образом.

Таблица 17.3

СОЛЕВЫЕ МОСТИКИ В ДЕЗОКСИГЕМОГЛОБИНЕ ¹⁾

Между α -цепями:

Остаток Lys-127 α_1 -цепи с карбоксильной группой С-концевого Arg-141 α_2 -цепи
 Остаток Lys-127 α_2 -цепи с карбоксильной группой С-концевого Arg-141 α_1 -цепи
 Остаток С-концевого Arg-141 α_1 -цепи с карбоксильной группой Asp-126 α_2 -цепи
 Остаток С-концевого Arg-141 α_2 -цепи с карбоксильной группой Asp-126 α_1 -цепи

Между α - и β -цепями:

Остаток Lys-40 α_1 -цепи с карбоксильной группой С-концевого His-146 β_2 -цепи
 Остаток Lys-40 α_2 -цепи с карбоксильной группой С-концевого His-146 β_1 -цепи

Внутрицепочечный мостик в β -цепи:

Остаток С-концевого His-146 с карбоксильной группой Asp-94

¹⁾ Индивидуальные α - и β -цепи различаются индексами (α_1 и α_2 , β_1 и β_2). Солевые мостики показаны на рис. 17.25.

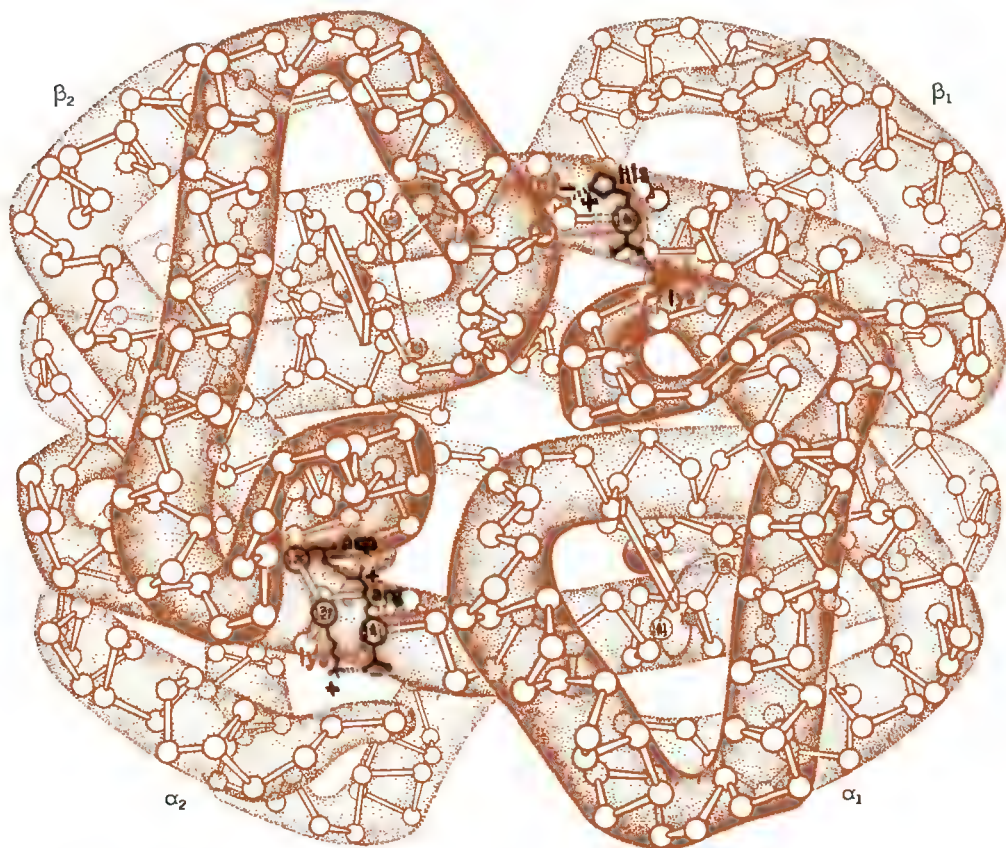


РИС. 17.25. Проекция молекулы дезоксигемоглобина, иллюстрирующая значение солевых мостиков; эта проекция отличается от проекции, показанной на рис. 1.5, тем, что молекула повернута на 90° (рисунок И. Гейса).

На рис. 1.5, А схематически изображена молекула дезоксигемоглобина лошади, если смотреть на молекулу в направлении оси симметрии второго порядка. На рис. 1.5, Б показана эта же проекция для молекулы оксигемоглобина. Как это обсуждается ниже, оксигенация сопровождается значительными конформационными перестройками молекулы, которые включают в себя разрыв определенных солевых мостиков. Наконец, на рис. 17.25 показана еще одна проекция для дезоксигемоглобина.

Наиболее существенное различие между дезоксигемоглобином и оксигемоглобином состоит в том, что в первом присутствует несколько солевых мостиков, которые разорваны в последнем. В дезоксигемоглобине каждая β -цепь имеет внутрицепочечный солевой мостик и образует мостик с α -цепью; всего в расчете на две β -цепи имеется четыре солевых мостика. Кроме того, четыре солевых мостика образованы между двумя α -цепями. Итого в дезоксигемоглобине имеется восемь солевых мостиков, которых нет в оксигемоглобине. Все они показаны на рис. 17.25. Кроме того, эти восемь электростатических связей перечислены в табл. 17.3.

В оксигемоглобине все четыре цепи слегка повернуты относительно их положений в де-

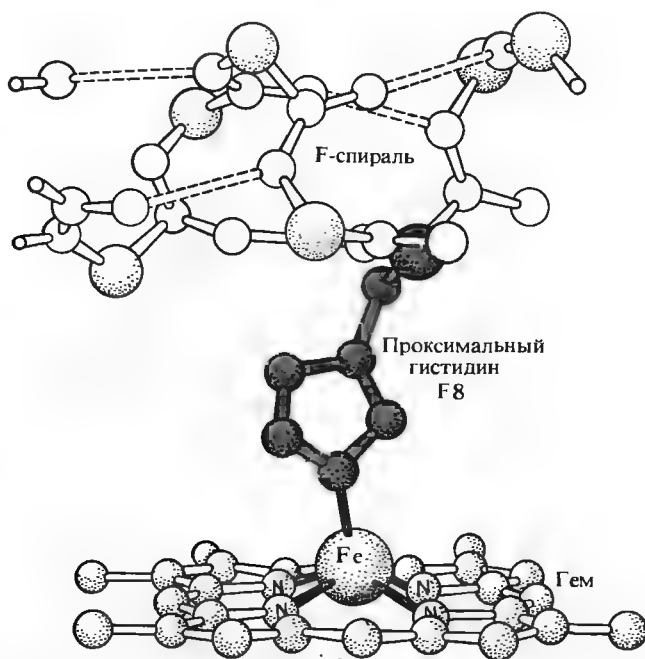


РИС. 17.26. Окружение гема в дезоксигемоглобине или дезоксимиоглобине (рисунок И. Гейса).

зоксигемоглобине. Наибольшее смещение характерно для β -цепей, которые сближаются примерно на 7 Å. Это перемещение заметно при сравнении рис. 1.5, А с рис. 1.5, Б.

Причину конформационных изменений можно уяснить, если рассмотреть эффект от связывания молекулы O_2 с железом гема. В дезоксигемоглобине каждый атом железа образует координационные связи с пятью лигандами. На рис. 17.26 видно, что четыре лиганда принадлежат порфируну, а пятым является атом азота имидазола ближайшего гистидина. Атом железа находится в высокоспиновом состоянии, поэтому он смещен на 0,3 Å из плоскости гема. При оксигенации молекула O_2 занимает координационное место шестого лиганда и переводит железо в низкоспиновое состояние. Вследствие этого атом железа перемещается в плоскость гема, порфириновое кольцо смещается, и это в свою очередь вызывает другие структурные изменения в белке, в том числе разрыв солевых мостиков. Перестройка дезокси- в оксиструктуру (у которой все солевые мостики разорваны) происходит постепенно по мере того, как связывается кислород и разрываются солевые мостики. Однако о деталях строения промежуточных структур в настоящее время можно только догадываться.

В соответствии с изложенными принципами механизм функционирования гемоглобина включает в себя, по крайней мере частично, механизмы модели МУШ и модели последовательных изменений, или индуцированного соответствия. Дезоксистерука является «напряженной» вследствие ограничений, налагаемых солевыми мостиками, а оксиформа, свободная от этих ограничений, соответствует «релаксированному» состоянию. Эти представления хорошо согласуются с концепцией МУШ. Однако переход между «напряженной» и «релаксированной» формами может быть индуцирован связыванием кислорода, которое является причиной перемещения железа гема, что в свою очередь влияет на конформацию других частей белка. Это придает механизму черты модели индуцированного соответствия.

Имеющаяся структурная информация для двух форм позволяет дать приемлемое объяснение природы боровских протонов, которые освобождаются при оксигенации. За щелочной эффект Бора (pK_b) могут быть ответственны остатки С-концевых гистидинов β -цепей и N-концевые аминогруппы α -цепей. Согласно табл. 17.2, при оксигенации значения pK основных боровских групп изменяются от 7,6 до 6,2. В дезоксиформе каждый С-концевой гистидин (His-146) связан со свободной карбоксильной группой Asp-94 той же цепи (см. рис. 17.25 и табл. 17.3). В результате pK этих гистидинов должно существенно увеличиться. Но при оксигенации разрывается солевой мостик с карбоксиллом, pK уменьшается и в результате высвобождаются ионы водорода (количество их, конечно, зависит от pH). Считается, что около 40% щелочного эффекта Бора обусловлено взаимодействием His-146 — Asp-94. Концевые α -аминогруппы являются источником еще 30% боровских протонов, ответственных за щелочной эффект. Имеются основания думать, что эти группы участвуют в связывании анионов и это должно влиять на значения их pK . Группы, ответственные за оставшиеся 30% щелочного эффекта Бора, еще не идентифицированы. Молекулярная природа кислотных боровских протонов также еще не выяснена.

Рис. 1.5, А иллюстрирует способ связывания ДФГ, как его представляют в настоящее время. Маленькая молекула органического фосфата помещается в полости, расположенной вдоль оси второго порядка дезоксигемоглобина, где она связывается с двумя β -субъединицами и нейтрализует группу положительных зарядов на β -цепях. Такой способ связывания вдоль оси симметрии второго порядка помогает объяснить стехиометрию связывания — на тетрамер дезоксигемоглобина связывается одна молекула ДФГ. При оксигенации конфигурация положительных зарядов около оси второго порядка резко изменяется (см. рис. 1.5, Б), и молекула ДФГ уже не способна взаимодействовать с этой частью молекулы. Следовательно, молекула ДФГ может «скреплять» только дезокси-структуру.

Краткие выводы

Главную роль в биологической регуляции играют мультилигандные взаимодействия с макромолекулой. Примером может служить ингибирование по типу обратной связи, посредством которого продукт биосинтетического процесса взаимодействует с первым ферментом цикла и изменяет его активность (путь биосинтеза пиримидина, в котором первым ферментом является АКТаза).

АКТаза представляет собой мультисубъединичный белок с шестью местами связывания субстрата и с шестью местами связывания аллостерического ингибитора СТР. На выяснение механизмов, с помощью которых модулируется активность этого и других аллостерических белков, было затрачено много усилий. Экспериментальные данные обычно интерпретируются в рамках схемы, предусматривающей согласованные конформационные изменения субъединиц (модель Моно — Уаймена — Шанжё), или схемы, предполагающей серию последовательных структурных изменений.

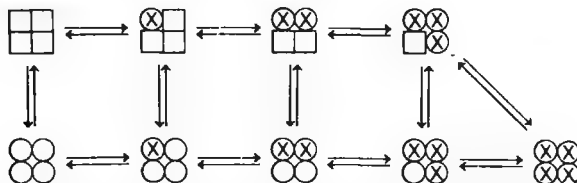
Другим хорошо изученным аллостерическим белком является гемоглобин. На величину сродства гемоглобина к кислороду влияют ионы H^+ , а также молекулы органических фосфатов и CO_2 . Проведены физиологические исследования, в которых изучалось влияние некоторых из этих факторов. В связи с тем что кристаллическая структура этого белка определена с высоким разрешением, в настоящее время можно изучать взаимосвязь между его структурой и механизмом функционирования на молекулярном уровне.

Задачи

17.1. Аллостерический фермент был исследован с помощью ряда физических методов, и была найдена некая физическая характеристика P , которая зависит от конформации или формы молекулы фермента. Д-р А изучает связывание аналога субстрата S' (который присоединяется к месту связывания субстрата, но не превращается в продукт). Кривая связывания имеет вид гиперболы. Д-р А измеряет $\bar{y}_{S'}$ (степень насыщения фермента S') и в то же время находит величину P при каждом значении $\bar{y}_{S'}$. Примечательно, что P изменяется пропорционально изменению $\bar{y}_{S'}$: относительное изменение P равно $\sim 0,30$, когда $y_{S'} = 0,30$; оно равно $0,60$, когда $y_{S'} = 0,60$ и т.д. Затем д-р А измеряет связывание аллостерического ингибитора I с ферментом, которое описывается сигмоидной кривой. Он обнаруживает, что, когда I связывается с ферментом, никаких изменений в величине P не наблюдается. Д-р А приходит в возбуждение и восклицает: «Фермент ведет себя точно так, как я предсказывал, исходя из модели Моно — Уаймена — Шанжэ (МУШ) для аллостерических эффектов». Он описывает свои эксперименты и выводы и посылает рукопись в научный журнал. В ответ редактор пишет д-ру А: «Мы можем опубликовать Ваши данные, но в Ваших выводах имеется небольшое противоречие. Хотя изменение P при связывании S' ферментом и согласуется с предсказаниями модели МУШ, модель также предсказывает некоторые изменения в характеристике P , когда с белком связывается I ». Кто прав, д-р А, редактор, или оба неправы? Объясните ваш ответ.

17.2. Связывание некоторого аллостерического ингибитора с молекулой аллостерического фермента само по себе имеет слабо выраженный сигмоидный характер, фактически оно описывается гиперболой. То же справедливо в отношении связывания только аллостерического активатора A . Однако в присутствии A связывание I приобретает сильно выраженный сигмоидный характер, а в присутствии I кривая связывания A тоже становится отчетливо сигмоидной. Д-р Альфа интерпретирует эти результаты следующим образом: «Данные согласуются с моделью двух состояний МУШ только в том случае, если $L \gg 1$ [напомним, что $L = (T_0)/(R_0)$], I связывается с белком только в состоянии T , а A — только в состоянии R ». Д-р Омега отвечает, что данные не соответствуют предсказаниям модели МУШ независимо от величины L . Кто прав, д-р Альфа, д-р Омега, или никто из них не прав? Выберите и обоснуйте один из этих трех вариантов, а также исключите два других с помощью тщательно обоснованных логических рассуждений.

17.3. Изучают некий фермент, кооперативные эффекты для которого рассматривают как следствие комбинации согласованных изменений и изменений, вызванных индуцированным соответствием. Схема имеет следующий вид, где X обозначает занятость места связывания на субъединице:



Заметим, что для состояний в верхнем ряду при связывании X происходят индуцированные изменения, однако наложенные на структуру ограничения заставляют все субъединицы находиться в одной и той же конформации, что приводит к нижнему ряду состояний. Пусть микроскопическая константа диссоциации для связывания X в нижнем ряду состоя-

ний равна k_0 , а для связывания в верхнем ряду она равна $k_i = k_0/c$. Пусть L обозначает отношение концентраций структур в левых частях верхнего и нижнего рядов. Выведите выражение для степени насыщения ($\bar{y}$) фермента лигандом X в зависимости от величин L , c и $\alpha = (X)/k_0$. Сравните это выражение с соответствующим уравнением для модели МУШ и прокомментируйте результат. Выведите выражения для констант равновесия r_1 , r_2 и r_3 для каждой пары состояний по вертикали, которые отвечают 1, 2 и 3 связанным молекулам лиганда соответственно. Выразите эти константы равновесия через величины L и c . Если $L = 10^3$ и $c = 10^{-2}$, то на какой стадии связывания субстрата наложенные на структуру ограничения приведут к тому, что будут происходить преимущественно согласованные структурные изменения? Другими словами, какова наименьшая величина i , при которой значение r_i обеспечит смещение равновесия в сторону согласованных изменений структуры субъединиц? Дайте ответ на тот же вопрос для случая $L = 10^4$ и $c = 10^{-2}$. Обратите внимание, что в этой схеме для каждой формы фермента, связанного с лигандом, возможно много разных микросостояний, и это необходимо принимать во внимание при выводе любого из уравнений.

17.4. Предположим, что белок P взаимодействует с лигандом в соответствии со следующей схемой:



где характеристические константы k имеют одинаковые значения для каждого из мест связывания на белке. Исходный белок может взаимодействовать также с единственной молекулой лиганда A :



с константой диссоциации k_A . Форма PA не может взаимодействовать с L . Выведите выражение для степени насыщения y_L белка лигандом L в зависимости от величин k , k_A , (L) и (A) . Рассчитайте приблизительно зависимость y_L от (L) при разных значениях (A) . Получите выражения для кажущихся макроскопических констант диссоциации K_1 , K_2 , K_3 и K_4 , которые отражают взаимодействие L с белком. Обратите внимание, что здесь K_i определяется соотношением $K_i = (PL_0)(L)/(PL_i)$, где (PL_0) — суммарная концентрация всех форм белка, не связанных с лигандом; соответственно для $i = 2, 3, 4$ $K_i = (PL_{i-1})(L)/(PL_i)$. Как эти макроскопические константы зависят от (A) ? Каковы их относительные значения при $(A) = 0$? При $(A) = k_A$? При $(A) = 9k_A$? Приводит ли увеличение (A) к появлению кажущейся кооперативности при связывании L ? Почему да или почему нет?

17.5. В случае аллостерического фермента со специфическими и удаленными друг от друга рецепторными местами для лигандов A и B были получены следующие данные: 1) связывание одного A описывается сигмоидной кривой; 2) связывание B в присутствии насыщающих количеств A также описывается сигмоидной кривой; 3) связывание одного B описывается сигмоидной кривой. Утверждается, что эти данные можно объяснить в рамках модели двух состояний МУШ, если предположить, что $L = (T_0)/(R_0) \gg 1$ и $c = 0$ для A и $c \gg 1$ для B (напомним, что $c = k_R/k_T$). Согласны ли вы с этим утверждением? Объясните почему.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Benesch R. E., Benesch R.*, 1974. The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin, *Adv. Protein Chem.*, **28**, 211. [Ясно написанный обзор, в котором довольно полно обсуждаются разные аспекты взаимосвязи между органическими фосфатами и гемоглобином.]
- Dickerson R. E., Geis I.*, 1981. *Proteins: Structure, Function, and Evolution*, Menlo Park, Calif., Benjamin-Cummings. [В гл. 3 дается четкое изложение структуры и функции гемоглобина.]
- Edelstein S. J.*, 1975. Cooperative interactions in hemoglobin, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 209.
- Hammes G. G., Wu C.-W.*, 1971. Regulation of enzyme activity, *Science*, **172**, 1205.
- Jacobson G. R., Stark G. R.*, 1973. Aspartate transcarbamylases. In: *The Enzymes*, vol. 9, ed. P. D. Boyer, New York, Academic Press, p. 225. [Обширный обзор, посвященный кооперативным свойствам, каталитическому механизму, генетике и другим вопросам.]
- Koshland D. E., Jr., Némethy G., Filmer D.*, 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry*, **5**, 365. [Детальное описание моделей для аллостерических механизмов.]
- Monod J., Wyman J., Changeux J.-P.*, 1965. On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88. [Хорошо известная работа, в которой дается ясное изложение модели МУШ для аллостерических белков.]
- Perutz M. F.*, 1970. Stereochemistry of cooperative effects of hemoglobin, *Nature*, **228**, 726. [Суммированы ранние структурные работы по гемоглобину и взаимосвязи между его структурой и функциями.]
- Perutz M. F.*, 1978. Hemoglobin structure and respiratory transport, *Scientific American*, **239**(6), 92. [Увлекательное обсуждение структуры и механизмов функционирования гемоглобина.]
- Schachman H. K.*, 1974. Anatomy and physiology of a regulatory enzyme: Aspartate transcarbamylase, *Harvey Lectures*, **68**, 67. [Хороший обзор, основанный главным образом на работах лаборатории Шлахмана.]

Специальная

- Adair G. S.*, 1925. The hemoglobin system, VI: The oxygen dissociation curve of hemoglobin, *J. Biol. Chem.*, **63**, 529.
- Benesch R., Benesch R. E.*, 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 162.
- Chanutin A., Curnish R. R.*, 1967. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 96.
- Eisenberger P., Shulman R. G., Kincaid B. M., Brown G. S., Ogawa S.*, 1978. Extended x-ray absorption fine structure determination of iron nitrogen distances in haemoglobin, *Nature*, **274**, 30.
- Fermi G.*, 1975. Three-dimensional Fourier synthesis of human deoxyhemoglobin at 2,5 Å resolution: Refinement of the atomic model, *J. Mol. Biol.*, **97**, 237.
- Gelin B. R., Karplus M.*, 1977. Mechanism of tertiary structural change in hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 801.
- Gennis L. S.*, 1976. Negative homotropic cooperativity and affinity heterogeneity: Preparation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with maximal affinity homogeneity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3928.
- Kilmartin J. V., Rossi-Bernardi L.*, 1973. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates, *Physiol. Rev.*, **53**, 836.
- Szabo A., Karplus M.*, 1972. A mathematical model for structure — function relations in hemoglobin, *J. Mol. Biol.*, **72**, 163.

18.1. Усреднение по конформациям

В гл. 5 и 6 мы уделили значительное внимание тем факторам, которые играют важную роль в формировании структуры белков и нуклеиновых кислот. Из-за сложности и широты проблемы предсказания структуры этих биополимеров на основании их аминокислотной или нуклеотидной последовательности наше рассмотрение было в основном описательным и мы лишь бегло останавливались на тех факторах, которые должны быть приняты во внимание. В этой главе рассмотрение конформаций полимеров будет в значительной мере аналитическим. При этом мы, однако, должны будем оставить в стороне некоторые сложные вопросы, затронутые в гл. 5 и 6; например, в настоящее время отсутствует хорошая теория структуры растворителя и взаимодействий полимер — растворитель, которая позволила бы достаточно строго учесть влияние растворителя при математическом описании конформаций полипептидов. Вместо этого мы сосредоточим внимание на конфигурационной статистике полимерных молекул, когда статистические оценки свойств цепей получаются путем усреднения по всем конформациям, с весовыми множителями, определяемыми потенциалами вращения вокруг связей цепи. Получаемые при этом конформационные свойства отражают геометрические характеристики цепи (углы между связями и длины связей) и препятствия для вращения остова. Процедура усреднения по всем конформациям означает, что мы определяем средние свойства «статистического клубка», которые, естественно, отличаются от свойств одной уникальной конформации, нередко играющей важную роль при функционировании многих биологически активных макромолекул.

При статистическом анализе цепи основной целью является вычисление внутрицепочечных расстояний, т.е. средних расстояний между сегментами цепи, например между ее концами. Для этого необходимо провести усреднение рассматриваемого расстояния по всем конформациям в соответствии с принципами статистической механики. С помощью конформационной статистики полипептидов мы можем глубже проникнуть в сущность процесса сворачивания белковых молекул. В частности, статистика гомополимеров и сополимеров глицина, аланина и пролина дает ключ к пониманию роли этих остатков в формировании конформации белка.

Существуют важные соотношения, связывающие средний квадрат расстояния между концами цепи и гидродинамические и другие физические свойства клубка. Например, характеристическая вязкость и коэффициент седиментации обычно используются для оценки размеров клубков. Эти гидродинамические параметры являются важнейшим источником информации не только для гибких клубков, но и для жестких червеобразных цепей, например для высокомолекулярной ДНК. Для описания конформационных свойств таких цепей используется специальная персистентная модель, или модель червеобразной цепи.

В этой главе мы рассмотрим как идеализированные, так и реальные цепи. Первые — такие, как свободно-сочлененная цепь и цепь со свободным вращением — служат исходным пунктом для анализа реальных цепей. Наше внимание будет сосредоточено на оценке статистических свойств конформаций цепи; связь между конформациями и наиболее распространенными гидродинамическими свойствами будет рассмотрена в гл. 19.

18.2. Определение параметров, зависящих от конформации

На рис. 18.1 схематически изображена гипотетическая полимерная цепь, в которой кружками обозначены атомы или группы в цепи. Связи последовательно перенумерованы от 1 до n , так что i -я связь соединяет $(i-1)$ -ю и i -ю группы. Двугранные углы вращения (см. гл. 5) обозначены через ϕ_2 до ϕ_{n-1} . До тех пор пока мы ограничиваемся рассмотрением конформации остова, углы вращения ϕ_1 и ϕ_n остаются неопределенными и не имеют смысла, поскольку вращение вокруг этих связей не приводит к изменению конформации остова.

Двугранные углы вращения ϕ были рассмотрены и определены нами в гл. 5. В статистике полимерных цепей, однако, принято считать состоянием с $\phi = 0^\circ$ *транс*-конформацию, а не *цис*-конформацию, как мы делали в гл. 5 при рассмотрении конформаций пептидов¹. Для того чтобы не было противоречия с обычной терминологией, принятой в химии полимерных молекул, мы в этой главе будем приписывать значение $\phi = 0^\circ$ *транс*-конформациям.

При анализе конформаций реальных цепей мы предполагаем, что все длины связей и углы между связями жестко фиксированы. Это допущение не вносит существенной неточности в анализ. Например, отклонения углов между связями от их наиболее вероятных значений малы и имеют противоположные знаки, компенсируя, таким образом, друг друга. Поэтому конформация цепи как целого определяется значениями углов вращения ϕ_i . Изменяя эти углы во всем диапазоне (от 0 до 2π каждый), мы можем получить полный набор возможных конформаций остова.

РАССТОЯНИЕ МЕЖДУ КОНЦАМИ ЦЕПИ И РАДИУС ИНЕРЦИИ

Из характеристик цепей, зависящих от конформации, чаще всего рассматриваются расстояние между концами цепи и радиус инерции. Каждый из этих параметров может быть определен экспериментально. Вектор $\mathbf{r}$, соединяющий концы цепи, можно представить как сумму векторов связей $\hat{\mathbf{i}}_i$, где каждый вектор $\hat{\mathbf{i}}_i$ коллинеарен i -й связи и соединяет элементы $i-1$ и i :

$$\mathbf{r} = \sum_{i=1}^n \hat{\mathbf{i}}_i \quad (18.1)$$

Рис. 18.2 иллюстрирует это суммирование: Длина r вектора $\mathbf{r}$ равна $(\mathbf{r} \cdot \mathbf{r})^{1/2}$, или

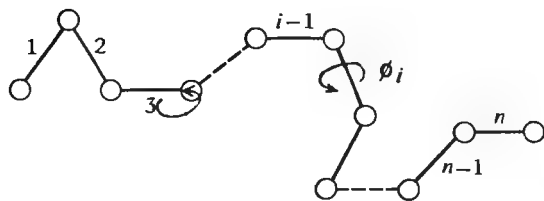


РИС. 18.1. Схематическое изображение полимерной цепи.

¹ Одной из причин выбора *транс*-конформации в качестве точки отсчета является то, что цепь, у которой все углы соответствуют *транс*-положению, можно легко изобразить или собрать из молекулярных моделей. Очевидно, что цепь, у которой все углы находятся в *цис*-положении, не может быть представлена каким-нибудь достаточно ясным способом.

$$r^2 = \left(\sum_{i=1}^n \hat{l}_i \right) \left(\sum_{j=1}^n \hat{l}_j \right) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \quad (18.2)$$

Выделяя из суммы n диагональных членов ($i = j$) и предполагая для простоты, что длины всех связей одинаковы и равны l , мы получим¹

$$r^2 = nl^2 + 2 \sum_{j>i} \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \quad (18.3)$$

Средний квадрат расстояния между концами есть

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 + 2 \sum_{j>i} \langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle \quad (18.4)$$

где угловые скобки обозначают усреднение стоящих в них величин. Проблема вычисления среднего квадрата расстояния между концами сводится, таким образом, к проблеме вычисления средней проекции каждой связи на каждую из остальных.

Это среднее вычисляется с помощью законов статистической механики, согласно которым вероятность $p(\phi_2, \phi_3, \dots, \phi_{n-1}) d\phi_2 d\phi_3 \dots d\phi_{n-1}$ существования заданной конформации, характеризуемой углами вращения, которые лежат между ϕ_2 и $\phi_2 + d\phi_2$, между ϕ_3 и $\phi_3 + d\phi_3$ и т.д., дается просто бальмановским распределением по конформационным энергиям. Таким образом,

$$\begin{aligned} p(\phi_2, \phi_3, \dots, \phi_{n-1}) d\phi_2 d\phi_3 \dots d\phi_{n-1} \\ = \frac{\exp[-E(\phi_2, \phi_3, \dots)/kT] d\phi_2 d\phi_3 \dots}{\int_0^{2\pi} \dots \int_0^{2\pi} \exp[-E(\phi_2, \phi_3, \dots)/kT] d\phi_2 d\phi_3 \dots} \end{aligned} \quad (18.5)$$

где $E(\phi_2, \phi_3, \dots)$ соответствует энергии конформации, определяемой углами $\phi_2, \phi_3, \dots$. Для рассматриваемых здесь случаев эта энергия вычисляется на основании потенциальных функций внутреннего вращения, но в общем случае она может включать и другие факторы, например взаимодействия полимера с растворителем и их зависимость от конформации.

Произведение $\hat{l}_i \cdot \hat{l}_j$ зависит от значений, которые принимают углы вращения для связей, находящихся между $\hat{l}_i$ и $\hat{l}_j$, т.е. ориентация $\hat{l}_j$ по отношению к $\hat{l}_i$ зависит от $\phi_{j-1}, \phi_{j-2}, \dots, \phi_{i+1}$. Поэтому сумма (по всем $j > i$) $\sum (\hat{l}_i \cdot \hat{l}_j)$ зависит от всего набора углов враще-

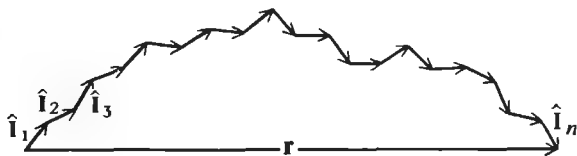


РИС. 18.2. Вектор r , соединяющий концы цепи, равен сумме векторов связей.

¹ В уравнении (18.3) и других уравнениях этой главы символ $\sum_{j>i}$ понимается как эквивалентный двойному суммированию $\sum_{j=i+1}^n \sum_{i=1}^n$.

ния, и ее среднее значение равно

$$\sum_{j>i} \langle \hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j \rangle = \int_0^{2\pi} \cdots \int_0^{2\pi} \left[\sum_{j>i} (\hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j) p(\phi_2, \phi_3, \dots) \right] d\phi_2 d\phi_3 \cdots \quad (18.6)$$

Хотя выражение (18.6) может показаться очень громоздким, для многих случаев вычисление удастся выполнить до конца. Подстановка формулы (18.6) в (18.4) дает $\langle r^2 \rangle$.

Итак, связь между $\langle r^2 \rangle$ и конформациями цепи точно задается формулами (18.5) и (18.6). Сдвиг большинства минимумов функции $E(\phi_2, \phi_3, \dots)$ в область больших значений r^2 приведет к увеличению $\langle r^2 \rangle$. Если функция $E(\phi_2, \phi_3, \dots)$ имеет узкий и притом единственный минимум при $\phi'_2, \phi'_3, \dots$, то $\langle r^2 \rangle$ будет приближаться к тому значению, которым характеризуется эта конформация с углами $\phi'_2, \phi'_3, \dots$. В пределе, когда функция $E(\phi_2, \phi_3, \dots)$ является постоянной при всех $\phi_2, \phi_3, \dots$ (цепь со свободным вращением), $\langle r^2 \rangle$ представляет собой просто арифметическое среднее r^2 для всех конформаций. Ясно, таким образом, что $\langle r^2 \rangle$ отражает распределение по конформациям и в первую очередь наиболее вероятные конформации, которые принимает полимерная молекула.

Радиус инерции R_G определяется как среднеквадратичное расстояние от всех атомов или групп до их общего центра масс. Для заданной конформации цепи из $n + 1$ идентичного элемента (соединенного n связями; см. рис. 18.1)

$$R_G^2 = [1/(n + 1)] \sum_{i=0}^n R_{Gi}^2 \quad (18.7)$$

где R_{Gi} — расстояние от i -го элемента до центра масс цепи. Можно показать, однако (см. Дополнение 18.1), что

$$R_G^2 = [1/(n + 1)^2] \sum_{j>i} r_{ij}^2 \quad (18.8)$$

где через r_{ij} обозначено расстояние между i -м и j -м элементами (см. Flory, 1969). Поэтому вычисление радиуса инерции сводится к вычислению внутрицепочечных расстояний, подобно тому как это делается для расстояния между концами.

Дополнение 18.1

РАДИУС ИНЕРЦИИ

Рассмотрим систему, состоящую из $n + 1$ элемента. Пусть i -й элемент расположен в точке (x_i, y_i, z_i) и имеет массу m_i . Центром масс системы называется точка пространства, обладающая следующим свойством: если $\mathbf{s}_i$ является вектором, выходящим из центра масс и заканчивающимся в i -м элементе, то

$$\sum_{i=0}^n m_i \mathbf{s}_i = 0$$

Когда система состоит из элементов с одинаковой массой, это соотношение сводится к

$$\sum_{i=0}^n \mathbf{s}_i = 0$$

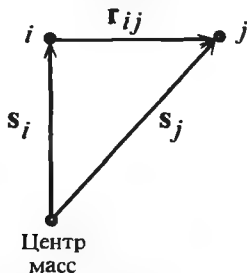
Если положение центра масс известно, нетрудно вычислить радиус инерции, используя формулу (18.7). Часто, однако, удобно иметь выражение для радиуса инерции, которое зависит только от

внутренних координат полимера [см. формулу (18.8)]. Мы покажем сейчас, что эти два выражения эквивалентны.

Проще всего начать с суммы в формуле (18.8). Она может быть записана как

$$\sum_{j>i} r_{ij}^2 = (1/2) \sum_{j=0}^n \sum_{i=0}^n \mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{ij}$$

где $\mathbf{r}_{ij}$ — это вектор между сегментами i и j полимера; мы использовали тот факт, что $\mathbf{r}_{ij} = 0$, если $i = j$. Рассмотрим два произвольных сегмента полимера, i и j , изображенных на рисунке. Если $\mathbf{s}_i$ и



$\mathbf{s}_j$ — это векторы, идущие из центра масс к этим элементам, то ясно, что $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{s}_j - \mathbf{s}_i$. Поэтому двойная сумма может быть преобразована к виду

$$(1/2) \sum_{j=0}^n \sum_{i=0}^n (\mathbf{s}_j - \mathbf{s}_i) \cdot (\mathbf{s}_j - \mathbf{s}_i) = (1/2) \sum_{j=0}^n \sum_{i=0}^n (\mathbf{s}_i^2 + \mathbf{s}_j^2 - 2\mathbf{s}_i \cdot \mathbf{s}_j)$$

Каждый член в последней сумме легко вычислить. Из формулы (18.7) мы знаем, что суммирование по i $\mathbf{s}_i^2$ дает $(n+1)R_G^2$. Суммирование по j приводит просто к появлению добавочного множителя $(n+1)$. Аналогично двойное суммирование $\mathbf{s}_j^2$ дает $(n+1)^2 R_G^2$. Третий член может быть записан как

$$- \sum_{j=0}^n \sum_{i=0}^n \mathbf{s}_i \cdot \mathbf{s}_j = - \sum_{j=0}^n \mathbf{s}_i \cdot \sum_{i=0}^n \mathbf{s}_j$$

В каждой из этих двух сумм суммирование может быть выполнено независимо, и, по определению центра масс, данному выше, обе суммы равны нулю. Таким образом, мы показали, что

$$\sum_{j>i} r_{ij}^2 = (n+1)^2 R_G^2$$

СРЕДНИЕ РАЗМЕРЫ ЦЕПИ В НЕВОЗМУЩЕННОМ СОСТОЯНИИ

При последующем рассмотрении конформационной статистики мы не будем принимать во внимание эффект исключенного объема, который состоит в физическом ограничении, в силу которого два сегмента цепи не могут одновременно находиться в одном месте пространства. В случае реальных цепей конформации, при которых происходит пространственное перекрывание соседних вдоль цепи элементов, должны быть исключены из рассмотрения, для чего им приписывается очень большая энергия. Однако взаимодействие между удаленными вдоль цепи сегментами обычно трудно поддается последовательному учету. Поэтому излагаемая здесь конформационная статистика ограничивается анализом размеров цепей, не возмущенных эффектами исключенного объема. Эти эффекты

рассматриваются отдельно в одном из последующих разделов, где будет показано, что влияние исключенного объема на размеры цепи и размеры невозмущенной цепи могут быть определены экспериментально.

При вычислении размеров невозмущенной цепи мы будем, как это принято, ставить около вычисляемого параметра индекс 0; например, $\langle r^2 \rangle_0$ есть средний квадрат расстояния между концами невозмущенной цепи.

По формуле (18.4) можно вычислить любое внутрицепочечное расстояние r_{ij} . Поэтому не удивительно, что с помощью формулы (18.8) величины $\langle R_G^2 \rangle_0$ и $\langle r^2 \rangle_0$ оказываются при определенных условиях прямо связанными. Это имеет место при $n \rightarrow \infty$, когда справедливо соотношение

$$\langle R_G^2 \rangle_0 = \langle r^2 \rangle_0 / 6 \quad (18.9)$$

(см. Flory, 1969). Таким образом, в пределе бесконечно длинных цепей средний квадрат расстояния между концами и средний квадрат радиуса инерции для невозмущенной цепи оказываются прямо связанными. Далее мы остановимся на вычислении в основном $\langle r^2 \rangle_0$, а не $\langle R_G^2 \rangle_0$. Однако используемые при этом методы могут быть распространены естественным образом и на вычисление $\langle R_G^2 \rangle_0$.

18.3. Свободно-сочлененная цепь

Свободно-сочлененная цепь является идеализированной моделью, в которой направление каждого вектора связи совершенно не коррелирует со всеми остальными векторами связей в цепи. В этой модели снимается даже условие фиксированности углов между связями, так что полимерная цепь является свободно-сочлененной. Следовательно, конформации цепи эквивалентны траекториям случайных блужданий, при которых каждый шаг длины l случайно ориентирован в пространстве по отношению к предшествующему.

АНАЛОГИЯ МЕЖДУ СВОБОДНО-СОЧЛЕНЕННОЙ ЦЕПЬЮ И ТРАЕКТОРИЕЙ ДИФФУНДИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛ ГАЗА

На рис. 18.3 схематически изображена свободно-сочлененная цепь. Средний квадрат расстояния между концами этой цепи легко определить по формуле (18.4). Величина $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle$ равна нулю для всех $i \neq j$, поскольку векторы $\hat{l}_i$ и $\hat{l}_j$ ориентированы по отношению друг к другу случайным образом. Последнее означает, что для каждой проекции $\hat{l}_j$ на $\hat{l}_i$ существует равная по абсолютной величине и противоположная по знаку проекция, так что сумма проекций равна нулю. Поэтому из (18.4) мы получаем

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 \quad (18.10)$$

Соотношение (18.10) совершенно аналогично зависимости смещения молекулы диффундирующего газа от времени: среднеквадратичное смещение пропорционально корню ква-

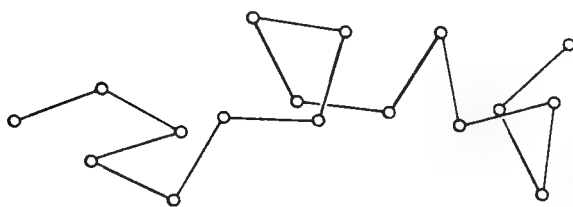


РИС. 18.3. Свободно-сочлененная цепь. Ориентация каждой связи по отношению к предшествующей совершенно произвольна.

дратному из времени, а в нашем случае $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ пропорционально $n^{1/2}$, где n аналогично времени.

ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОЕ ОТНОШЕНИЕ

Согласно формуле (18.10), величина $\langle r^2 \rangle_0$ является линейной функцией n для всех значений n . Для реальных цепей линейное соотношение между $\langle r^2 \rangle_0$ и n выполняется только в пределе бесконечно больших n , но даже и в этом случае $\langle r^2 \rangle_0/nl^2 \neq 1$. Отношение $\langle r^2 \rangle_0/nl^2$ называется *характеристическим*. В большинстве случаев асимптотическое значение ($n \rightarrow \infty$) характеристического отношения больше единицы. Его точное значение зависит от того, какие конформации являются предпочтительными и какова жесткость рассматриваемой цепи.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАССТОЯНИЙ МЕЖДУ КОНЦАМИ ЦЕПИ

Весьма интересно найти распределение расстояний между концами цепи, которое дает относительное число конформаций с данным расстоянием между концами. Чтобы определить эту функцию, введем прежде всего декартову систему координат и вычислим сначала среднюю длину проекции каждого вектора связи на какую-нибудь из осей координат. Будем исходить из того, что средняя проекция каждой связи может иметь с равной вероятностью положительный или отрицательный знак, как при случайном блуждании. Это позволит нам непосредственно получить статистическое распределение конформаций.

Рассмотрим среднюю длину проекции на ось x связи длины l (рис. 18.4, А). Средний квадрат проекции l_x^2 есть $l^2 \cos^2 \theta$, где θ — угол между вектором связи и осью x , а черта означает усреднение. Вычислить среднюю величину $\cos^2 \theta$ не составляет труда. Распределение значений $\cos \theta$ определяется тем, что все направления связи имеют равную вероятность. Поэтому число векторов в интервале углов от θ до $\theta + d\theta$ пропорционально площади кольца вокруг оси x , полученного при вращении вектора связи, который заключен в данном интервале углов θ . Эта площадь равна $2\pi l^2 \sin \theta d\theta$, и, следовательно, средний ква-

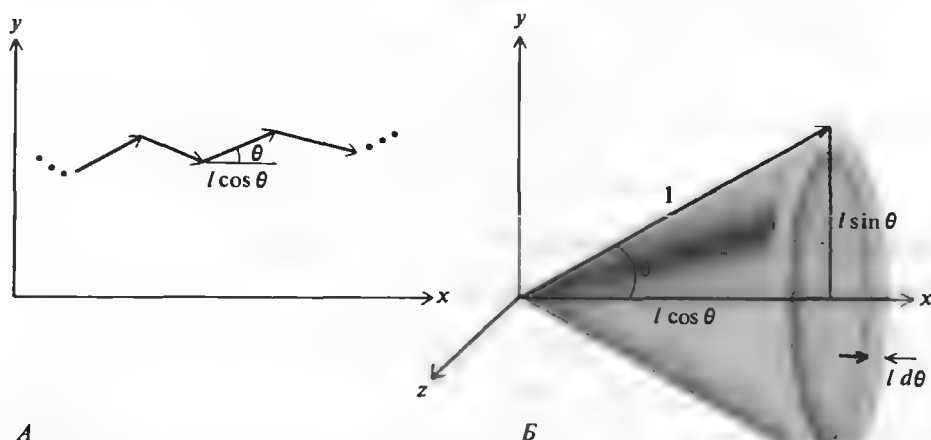


РИС. 18.4. Компоненты векторов связи вдоль оси x . А. x -Компоненты векторов связи равны $l \cos \theta$. Б. Вычисление распределения значений $\cos \theta$ для случайно ориентированных связей.

длат длины проекции определяется как

$$\bar{l}_x^2 = \frac{\int_0^\pi l^2 \cos^2 \theta (2\pi l^2 \sin \theta) d\theta}{\int_0^\pi 2\pi l^2 \sin \theta d\theta} = l^2/3 \quad (18.11)$$

Среднеквадратичная длина проекции на данную ось составляет $l/\sqrt{3}$.

Предположим теперь, что шаги со средней длиной $l/\sqrt{3}$ совершаются вдоль заданной оси со случайным равновероятным выбором отрицательного или положительного направления. Расстояние вдоль оси x , пройденное за n шагов (соответствующих n связям), равно

$$x = (n_+ - n_-)l/\sqrt{3} \quad (18.12)$$

где через n_+ и n_- обозначено число шагов в положительном и отрицательном направлениях соответственно, а $n = n_+ + n_-$. Вероятность $W(n_+, n_-, n)$ того, что будет сделано n_+ положительных и n_- отрицательных шагов при полном числе шагов n , равна

$$W(n_+, n_-, n) = (1/2)^n n! / n_+! n_-! \quad (18.13)$$

В этой формуле множитель $(1/2)^n$ есть вероятность существования определенной последовательности положительных и отрицательных шагов (например, $+-+-$ является одной из последовательностей для $n = 4$, $n_+ = 2$, $n_- = 2$), а член $n!/(n_+! n_-!)$ равен числу последовательностей шагов, которые характеризуются параметрами n_+ и n_- (для $n_+ = n_- = 2$ таких последовательностей шесть: $++--$; $+-+-$; $+--+$; $-++-$; $-+-+$ и $--++$). Соотношение (18.13) удобно рассматривать как функцию непрерывной переменной, воспользовавшись формулой Стирлинга:

$$\ln N! = N \ln N - N + (1/2) \ln 2\pi + (1/2) \ln N \quad (18.14)$$

Формула (18.14) справедлива для больших N ; подставляя ее в (18.13), мы предполагаем, что n , n_+ и n_- достаточно велики. Вводя замену $m = n_+ - n_-$ в (18.13) и имея в виду, что $n = n_+ + n_-$, воспользуемся формулой Стирлинга и получим

$$\begin{aligned} \ln W(m, n) = & n \ln(1/2) + n \ln n - n + (1/2) \ln 2\pi + (1/2) \ln n \\ & - \{[(n+m)/2] \ln[(n+m)/2] - (n+m)/2 + (1/2) \ln 2\pi \\ & + (1/2) \ln[(n+m)/2] + [(n-m)/2] \ln[(n-m)/2] \\ & - (n-m)/2 + (1/2) \ln 2\pi + (1/2) \ln[(n-m)/2]\} \end{aligned} \quad (18.15)$$

После некоторых упрощений выражение (18.15) преобразуется к виду

$$\begin{aligned} \ln W(m, n) = & (1/2) \ln n - \ln(n/2) - (1/2) \ln 2\pi \\ & - \{(n/2) \ln[(1+m/n)(1-m/n)] + (m/2) \ln[(1+m/n)/(1-m/n)] \\ & + (1/2) \ln[(1+m/n)(1-m/n)]\} \end{aligned} \quad (18.16)$$

Первые три слагаемых в правой части формулы (18.16) равны $\ln (n\pi/2)^{-1/2}$. Оставшуюся часть можно упростить для случая $|m/n| \ll 1$ (т.е. когда смещение m мало по сравнению с n). Физически это соответствует сравнительно малым размерам цепи, которые от-

вечают большинству конфигураций. При этих ограничениях можно использовать соотношения $\ln(1+x) \approx x$ и $\ln[(1+x)/(1-x)] \approx 2x$ для $|x| \ll 1$, которые позволяют упростить последнюю часть выражения (18.16) до

$$m^2/2n - m^2/n + m^2/2n^2 \approx -m^2/2n \quad (18.17)$$

Таким образом, мы получаем

$$\ln W(m, n) = \ln(2/n\pi)^{1/2} (-m^2/2n) \quad (18.18)$$

или

$$W(m, n) = \sqrt{2/n\pi} e^{-m^2/2n} \quad (18.19)$$

Это известное распределение Гаусса для разности числа шагов в положительном и отрицательном направлениях или наоборот.

Чтобы перейти от $W(m, n)$ к $W(x, n)$, прежде всего заметим, что $m^2 = 3x^2/l^2$. Далее следует внимательно отнестись к точному усреднению $W(x, n)$ и $W(m, n)$. $W(x, n)$ — это вероятность того, что величина x лежит в интервале между x и $x + dx$, отнесенная к единичному интервалу длины, а $W(m, n)$ — вероятность того, что $n_+ - n_- = m$, где m — целое число. Последнее означает, что при фиксированном n величина m может изменяться лишь на число, кратное двум¹⁾, и соотношение $W(x, n) = W(m, n)/(\text{интервал})$ требует подстановки интервала, эквивалентного двум единицам m , т.е. $2l/\sqrt{3}$. Поэтому

$$\begin{aligned} W(x, n) &= (\sqrt{3}/2l) W(m, n) \\ &= \sqrt{3/2\pi} (1/n^{1/2}l) \exp(-3x^2/2nl^2) \end{aligned} \quad (18.20)$$

Соотношение (18.20) представляет искомый результат.

Аналогичные выражения могут быть получены для $W(y, n)$ и $W(z, n)$. Для не слишком вытянутых цепей можно считать, что $W(x, y, z)dx dy dz$ — вероятность того, что x лежит в интервале от x до $x + dx$, y — в интервале от y до $y + dy$ и z — в интервале от z до $z + dz$ — равна произведению независимых вероятностей $W(x, n)dx$, $W(y, n)dy$ и $W(z, n)dz$, т.е.

$$W(x, y, z)dx dy dz = (\beta/\sqrt{\pi})^3 e^{-\beta^2 r^2} dx dy dz \quad (18.21)$$

где $\beta = (3/2nl^2)^{1/2}$ и $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$. Заметим, что $W(x, y, z)$ зависит от n , так же как от x , y и z ²⁾.

¹⁾ Поскольку $m = n_+ - n_-$, из уравнения (18.12) очевидно, что при изменении m на ± 2 x меняется на $\pm 2l/\sqrt{3}$.

²⁾ Стоит еще раз обратить внимание на все те предположения, которые были сделаны при выводе формулы (18.21). Во-первых, мы предполагали, что проекция связи на данную ось может иметь лишь значения $\pm l/\sqrt{3}$. Ясно, однако, что эта величина может непрерывно меняться от 0 до $\pm l$. Во-вторых, расстояние, пройденное вдоль одной оси, на самом деле не может не зависеть от расстояний, пройденных по другим осям. Например, рассмотрите ограничения на возможные проекции на остальные оси, если проекция на одну из осей достигает максимального возможного значения nl . Эти два предположения не приводят, однако, к серьезным ошибкам при больших n и $r \ll nl$, что является в то же время условием применимости формулы (17.14) и использовалось при выводе (18.19) из (18.16).

ДВА ВИДА ФУНКЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Существуют два вида функции распределения, которые основаны на формуле (18.21). Если мы поместим один из концов нашей полимерной цепи в начало системы координат, то формула (18.21) даст вероятность того, что конец вектора, соединяющего концы цепи, окажется в элементе объема $dx dy dz$ (см. рис. 18.5, А). Эта функция распределения изображена на рис. 18.5, Б. Ясно, что наибольшая плотность конформаций соответствует нулевому расстоянию между концами и что вытягивание цепи отвечает монотонному уменьшению вероятности появления таких конформаций. При $r = \beta^{-1} = \sqrt{(2/3)nl^2}$, которое много меньше половинны максимального возможного растяжения, $W(x, y, z)$ уменьшается в e раз по сравнению с максимальной величиной.

Вторым типом функции распределения является *радиальная функция* $W(r)dr$, которая соответствует вероятности того, что расстояние между концами заключено между r и $r + dr$, независимо от направления вектора $\mathbf{r}$. Она объединяет все элементы объема $dx dy dz$ в соотношении (18.21) (см. также рис. 18.5, А), которые лежат на расстоянии r от начала координат. Все эти элементы заключены в объеме $4\pi r^2 dr$ сферической оболочки радиуса r и толщины dr (см. рис. 18.6, А). Поэтому радиальная функция распределения равна

$$W(r)dr = (\beta/\sqrt{\pi})^3 e^{-\beta^2 r^2} 4\pi r^2 dr \quad (18.22)$$

Эта функция приведена на рис. 18.6, Б. Она имеет максимум не при нулевом r , а при значении, лишь немного меньшем среднеквадратичного расстояния между концами цепи, $\langle r^2 \rangle^{1/2}$. Причина того, что $W(r)$ не имеет максимума при $z = 0$, как функция $W(x, y, z)$, состоит в том, что сферическая оболочка радиуса r (рис. 18.6, Б) ограничивает тем больший объем, чем больше r (согласно выражению $4\pi r^2 dr$). Это приводит к некоторой компенсации экспоненциального уменьшения функции $e^{-\beta^2 r^2}$.

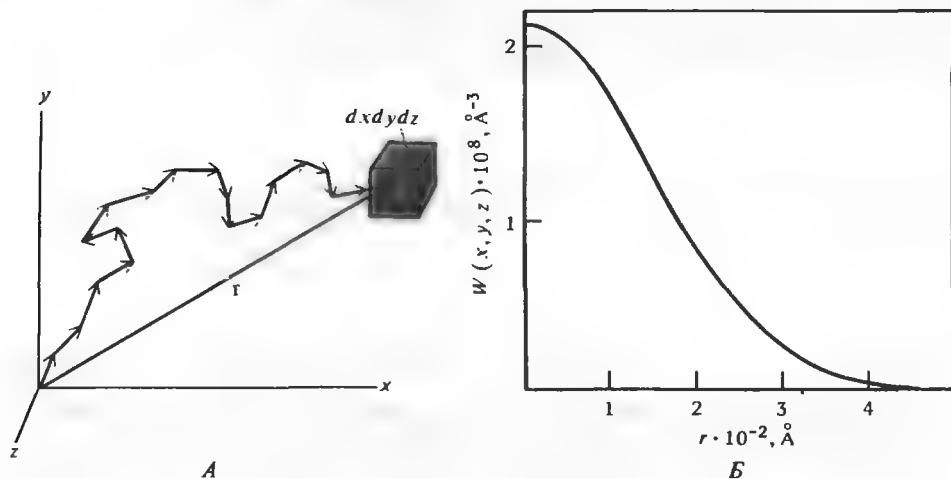


РИС. 18.5. Гауссова функция распределения. А. Вектор $\mathbf{r}$, соединяющий концы цепи, и элемент объема $dx dy dz$. Б. Плотность гауссова распределения $W(x, y, z)$ в зависимости от расстояния между концами для свободно-сочлененной цепи из 10^4 звеньев длиной $2,5 \text{ \AA}$. (Flory P. J., Principles of Polymer Chemistry, 1953, p. 403.)

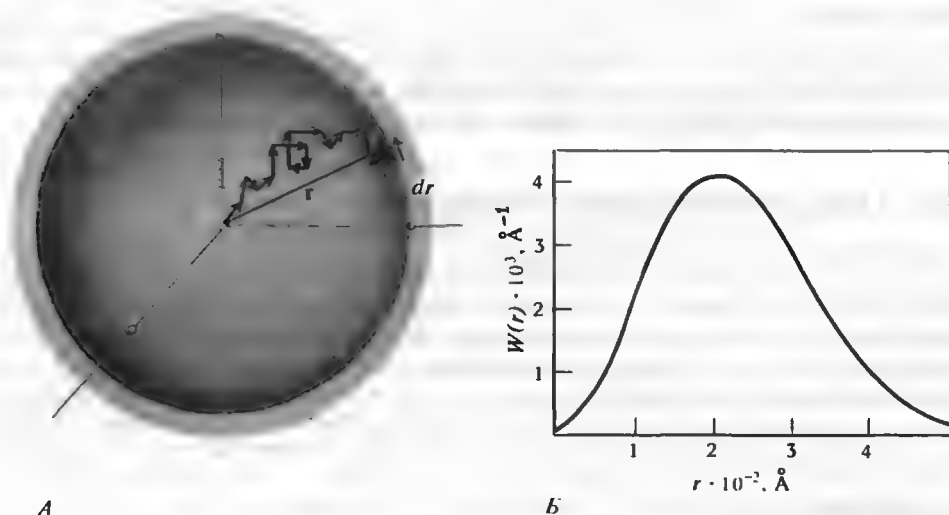


РИС. 18.6. Радиальная функция распределения. А. Вектор r , соединяющий концы цепи, и сферическая оболочка объемом $4\pi r^2 dr$. Б. Функция распределения $W(r)$ в зависимости от r для той же цепи, что и на рис. 18.5. (Flory P. J., Principles of Polymer Chemistry, 1953, p. 406.)

Функция распределения (18.22) может быть использована для вычисления $\langle r^2 \rangle_0$:

$$\langle r^2 \rangle_0 = \int_0^\infty r^2 W(r) dr / \int_0^\infty W(r) dr \quad (18.23)$$

Заметим, что нормировочный интеграл в знаменателе равен единице, поскольку функция распределения является нормированной. Из соотношения (18.23) нетрудно получить (задача 18.1), что

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 \quad (18.24)$$

Формула (18.24) согласуется с результатом вычисления $\langle r^2 \rangle_0$ [формула (18.10)], полученным ранее другим методом.

Гауссовы функции распределения, приведенные на рис. 18.5, Б и 18.6, Б имеют ряд важных особенностей. Так, распределение является весьма широким, и большинство конформаций заключено в области десятикратного изменения r . Эти конформации отвечают той области значений r , которая далека от максимального растяжения свободно-сочлененной цепи, когда $r = nl$. Конечно, полученные функции распределения были выведены в предположении, что $r \ll nl$, но из рис. 18.5, Б и 18.6, Б ясно, что $W(x, y, z)$ и $W(r)$ спадают практически до нуля гораздо раньше, чем достигается максимальное растяжение цепи. Более точное рассмотрение, справедливое при больших степенях растяжения, показывает, что функции распределения (18.21) и (18.22) являются хорошими приближениями вплоть до $r = nl/2$ (см. Flory, 1969).

ГАУССОВА ФУНКЦИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И РЕАЛЬНЫЕ ЦЕПИ

Очень важной особенностью гауссовой функции распределения является то, что все *реальные* цепи — с фиксированной геометрией связей, несвободным вращением, не возму-

щенные эффектами исключенного объема — могут быть описаны ею при $n \rightarrow \infty$. Причины этого рассматриваются в последнем разделе. Для более коротких цепей отклонение функции распределения от гауссовой в случае невозмущенных реальных полимерных молекул может быть весьма значительным. Например, функция распределения для жестких полимеров конечной длины имеет значительно более узкий и острый максимум.

18.4. Цепь со свободным вращением

Хотя модель свободно-сочлененной цепи очень полезна для понимания многих вопросов и служит удобной отправной точкой, она содержит много искусственных элементов. Некоторые из этих элементов устраняются введением ограничения, фиксирующего углы между связями. В результате получается цепь со свободным вращением, в которой повороты вокруг связей могут происходить совершенно беспрепятственно. На рис. 18.7 представлен пример цепи, у которой углы между связями (и дополнительные углы θ) фиксированы, но двугранные углы ϕ могут свободно меняться. (На рис. 18.7 углы θ различаются, но при последующем рассмотрении они будут считаться одинаковыми.)

ВЫЧИСЛЕНИЕ $\langle r^2 \rangle_0$

Пусть цепь содержит n связей. Вычисление $\langle r^2 \rangle_0$ требует оценки $\langle \sum_{j>i} (\hat{l}_i \cdot \hat{l}_j) \rangle$ [см. (18.4)], с усреднением по всем конформациям согласно формуле (18.6). Ясно, что, поскольку все конформации являются равновероятными, величина $\rho(\phi_2, \phi_3, \dots)$ постоянна. Следовательно, вычисления можно значительно упростить следующей процедурой. Очевидно, что $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_{i+1} \rangle = l^2 \cos \theta$. Рассмотрим теперь величину $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_{i+2} \rangle$, среднюю проекцию на направление $\hat{l}_i$ связи, расположенной через одну вдоль цепи. Поскольку угол поворота ϕ вокруг $\hat{l}_{i+1}$ меняется, реализуются все возможные ориентации $\hat{l}_i$ относительно $\hat{l}_{i+2}$ (рис. 18.8). Ясно, что все компоненты $\hat{l}_{i+2}$, перпендикулярные $\hat{l}_{i+1}$, взаимно уничтожаются при изменении ϕ . Компонента $\hat{l}_{i+2}$, параллельная $\hat{l}_{i+1}$, равна $l \cos \theta$, и она остается после усреднения. Проекция этой компоненты на $\hat{l}_i$ есть $l(\cos \theta)(\cos \theta) = l \cos^2 \theta$, и, таким образом, $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_{i+2} \rangle = l^2 \cos^2 \theta$. По индукции мы заключаем, что $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle = l^2 \cos^{j-i} \theta$. Поэтому (18.4) сводится к виду

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2l^2 \sum_{j>i} \alpha^{j-i} \quad (18.25)$$

где $\alpha = \cos \theta$.

Число комбинаций векторов связей в (18.25), которые разделены k углами между связями, равно $n - k$. Поэтому формулу (18.25) можно переписать с использованием одно-

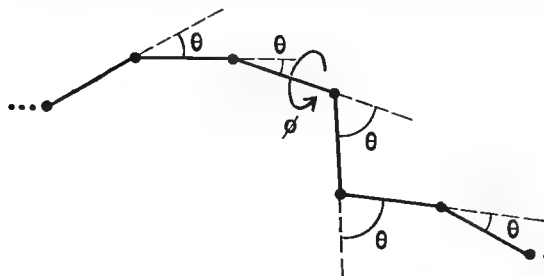


РИС. 18.7. Цепь со свободным вращением. Угол между связями, дополнительный к углу θ , фиксирован, а угол вращения ϕ может свободно меняться.

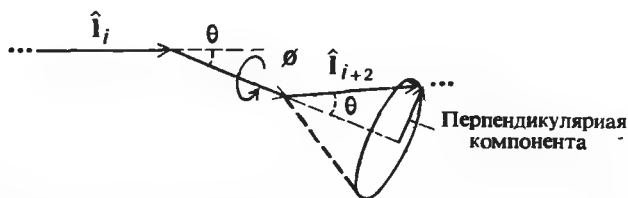


РИС. 18.8. Участок цепи со свободным вращением. При свободном изменении ϕ перпендикулярные компоненты векторов связей взаимно уничтожаются при усреднении.

кратного суммирования:

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2l^2 \sum_{k=1}^{n-1} (n-k)\alpha^k \quad (18.26)$$

где $k = j - i$.

Для вычисления суммы в соотношении (18.26) воспользуемся следующим приемом. Введем $S_m = \sum \alpha^k$, где сумма по k берется от $k = 1$ до $k = m$, и заметим, что $S_{m+1} = \alpha(1 + S_m)$ и $S_{m+1} - S_m = \alpha^{m+1}$. Эти два уравнения позволяют найти S_m :

$$S_m = (\alpha - \alpha^{m+1})/(1 - \alpha) \quad (18.27a)$$

Далее имеем

$$\begin{aligned} \sum_{k=1}^m k\alpha^k &= \alpha dS_m/d\alpha \\ &= \alpha[1 - (m+1)\alpha^m]/(1 - \alpha) + \alpha(\alpha - \alpha^{m+1})/(1 - \alpha)^2 \end{aligned} \quad (18.27b)$$

Подставив соотношения (18.27a, б) в (18.26) и проведя некоторые упрощения, получим

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 \left(\frac{1 + \alpha}{1 - \alpha} - \frac{2\alpha(1 - \alpha^n)}{n(1 - \alpha)^2} \right) \quad (18.28)$$

ПОВЕДЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОГО ОТНОШЕНИЯ

Из формулы (18.28) следуют два важных вывода. Во-первых, характеристическое отношение $\langle r^2 \rangle_0/nl^2$ зависит от n в отличие от случая свободно-сочлененной цепи [формула (18.10)]; эта зависимость существует для всех клубкообразных реальных цепей. Во-вторых, отношение $\langle r^2 \rangle_0/nl^2$ при больших n достигает асимптотического значения, не зависящего от n ; однако в отличие от свободно-сочлененной цепи асимптотический предел для цепи со свободным вращением не равен 1.

На рис. 18.9 приведен график зависимости безразмерного характеристического отношения $\langle r^2 \rangle_0/nl^2 = C_n$ от n для $\alpha = 1/3$; этот случай соответствует цепи с тетраэдрическими углами между связями (типа молекулы полиэтилена). Видно, что $\langle r^2 \rangle_0/nl^2$ приближается к своему асимптотическому значению при $n = 30$. Этот асимптотический предел равен

$$(\langle r^2 \rangle_0/nl^2)_{n \rightarrow \infty} = (1 + \alpha)/(1 - \alpha) \quad (18.29)$$

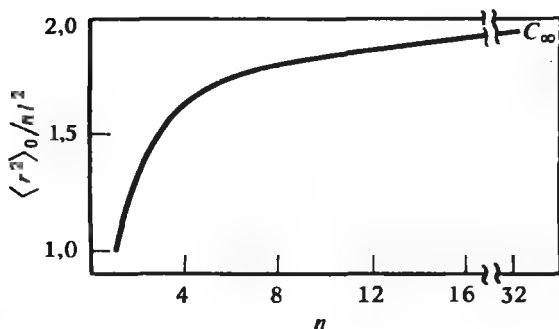


РИС. 18.9. Характеристическое отношение. Зависимость $\langle r^2 \rangle_0 / nl^2$ от n для цепи со свободным вращением и тетраэдрическими углами между связями.

В рассмотренном случае асимптотический предел характеристического отношения равен 2. Из уравнения (18.29) очевидно, что для подавляющего большинства цепей со свободным вращением и с углами между связями, соответствующими реальным цепям, $(\langle r^2 \rangle_0 / nl^2)_{n \rightarrow \infty} > 1$. Это связано с тем, что углы между связями, как правило, превышают 90° (а дополнительные углы меньше 90°), что отвечает $\alpha > 0$.

Стоит остановиться на физическом смысле графика на рис. 18.9. Для палочкообразной цепи, которую невозможно изогнуть, $\langle r^2 \rangle_0 \propto n^2 l^2$, так что $C_n \propto n$; таким образом, характеристическое отношение возрастает неограниченно с ростом n . Тот факт, что C_n для цепи со свободным вращением сначала возрастает с ростом n , а затем постепенно перестает зависеть от n , означает наличие определенной жесткости цепи на небольших расстояниях вдоль цепи (когда C_n увеличивается с ростом n) и приближение к свойствам свободно-сочлененной цепи при достаточно больших длинах цепи (когда C_n перестает зависеть от n). Напротив, поведение свободно-сочлененной цепи таково, что C_n не зависит от n для всех n . Совокупность этих фактов означает, что скорость приближения C_n к асимптотическому значению C_∞ является мерой жесткости цепи. Эта связь станет более ясной в разд. 18.9 и 18.10, где мы введем понятие статистического сегмента и персистентной длины.

18.5. Реальные цепи и поворотно-изомерная модель

Реальные цепи существенно отличаются от двух рассмотренных выше моделей тем, что они имеют довольно сложную потенциальную функцию для вращения связей. Это обстоятельство значительно усложняет вычисление $p(\phi_1, \phi_2, \dots)$ и $\langle r^2 \rangle_0$. Однако некоторые из этих трудностей можно обойти, воспользовавшись поворотно-изомерной моделью.

Рассмотрим простую молекулу, содержащую три связи (рис. 18.10, А). Будем считать, что энергия поворота вокруг центральной связи зависит от ϕ так, как это представлено на рис. 18.10, Б. Эта потенциальная функция имеет три четких локальных минимума, разделенных барьерами значительной высоты. В соответствии с обычным распределением Больцмана вероятность того, что ϕ лежит в интервале от ϕ до $\phi + d\phi$, равна

$$p(\phi) d\phi = e^{-E(\phi)/kT} d\phi \int_0^{2\pi} e^{-E(\phi)/kT} d\phi \quad (18.30)$$

Эта функция распределения имеет максимумы при значениях ϕ , соответствующих минимумам на рис. 18.10, Б. Для значений функции $E(\phi)$, превышающих значения в минимуме на несколько kT , величина $p(\phi)$ становится исчезающе малой. Таким образом, подавляющую часть времени цепь находится в состояниях около одного из трех минимумов.

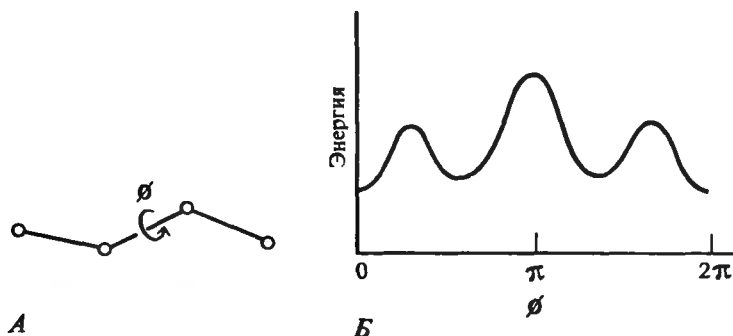


РИС. 18.10. Зависимость энергии поворота от двугранного угла. А. Гипотетическая цепь. Двугранный угол ϕ описывает повороты вокруг центральной связи. В этой главе условие $\phi = 0^\circ$ соответствует *транс*-конформации (дальнейшее обсуждение вопроса о двугранных углах можно найти в гл. 5). Б. Зависимость энергии от ϕ для гипотетической цепи.

Поэтому, если мы будем вычислять среднее расстояние между концами нашей простой цепи с тремя связями, то обнаружим, что лишь конформации вблизи минимумов функции $E(\phi)$, изображенной на рис. 18.10, Б, будут давать значительный вклад в среднее значение. Это же справедливо для вычисления любой средней характеристики, зависящей от конформации (т.е. от угла ϕ). Поэтому мы можем аппроксимировать цепи с помощью лишь трех состояний, которые отвечают трем минимумам функции $E(\phi)$, достигаемым при значениях ϕ , которые мы обозначим как ϕ_1 , ϕ_2 и ϕ_3 . Выбранные таким образом три состояния называются поворотными изомерами.

Вероятность появления любого заданного состояния ϕ_i в этой модели есть

$$p(\phi_i) = e^{-E(\phi_i)/kT} / \sum_{i=1}^3 e^{-E(\phi_i)/kT} \quad (18.31)$$

Выражение (18.31) значительно проще, чем (18.30). С использованием этой простой функции распределения мы можем найти теперь средние характеристики, зависящие от конформации.

В большинстве случаев поворотные потенциальные функции для каждой связи в длинном полимере усложняются из-за взаимозависимости отдельных поворотов. Это означает, что стерические препятствия при изменении угла ϕ_i зависят от значений углов ϕ_{i-1} и ϕ_{i+1} , соседних по отношению к рассматриваемому. Связано это с тем, что в полимере могут иметь место взаимодействия, например стерические ограничения между атомами, разделенными более чем одним углом вращения (рис. 18.11; см. также гл. 5, в которой рассматриваются энергетические диаграммы для полипептидов). Поэтому обычно выбирают такие поворотные-изомерные состояния, у которых минимальной является энергия пар соседних связей, а не отдельных связей. Средние значения конформационных параметров обычно вычисляются с помощью математических методов, включающих использование матриц, которые очень хорошо подходят для такого рода расчетов. Энергетические функции, необходимые для этих вычислений, строятся методами, рассмотренными в гл. 5 применительно к полипептидам. Результаты вычислений, основанных на поворотной-изомерной модели, во многих случаях очень хорошо согласуются с экспериментальными данными.

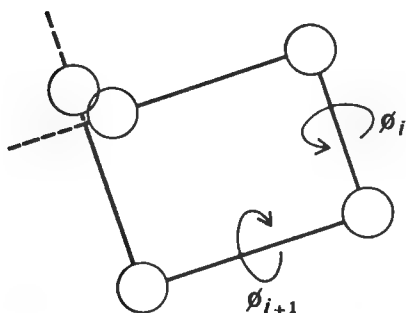


РИС. 18.11. Контакты между группами, расстояние между которыми зависит от двух углов вращения.

● 18.6. Вычисление внутрицепочечных расстояний в полипептидах

В этом разделе мы остановимся на вычислении внутрицепочечных расстояний в полипептидах. Это рассмотрение иллюстрирует методы, которые используются при статистической оценке свойств реальных цепей. Следует иметь в виду, однако, что полипептидная цепь представляет собой один из тех случаев, для которых поворотно-изомерная модель имеет ограниченную применимость.

На рис. 18.12 схематически изображена полипептидная цепь в плоской зигзагообразной конформации, когда все двугранные углы ϕ и ψ равны нулю. Повторяющиеся аминокислотные единицы имеют индексы от 0 до n . Углы поворота вокруг связей, примыкающих к i -му атому α -углерода C_i^α , обозначены через ϕ_i и ψ_i . (См. гл. 5, в которой рассматриваются углы ϕ_i и ψ_i . Напомним, что в настоящей главе мы используем условие $\phi_i = 0^\circ$ и $\psi_i = 0^\circ$ для *транс*-конфигураций относительно связей $N-C_i^\alpha$ и $C_i^\alpha-C_i'$ соответственно. Дальнейшее обсуждение можно найти в разд. 5.2. В табл. 5.1 приведены значения длин различных связей и углов между ними.)

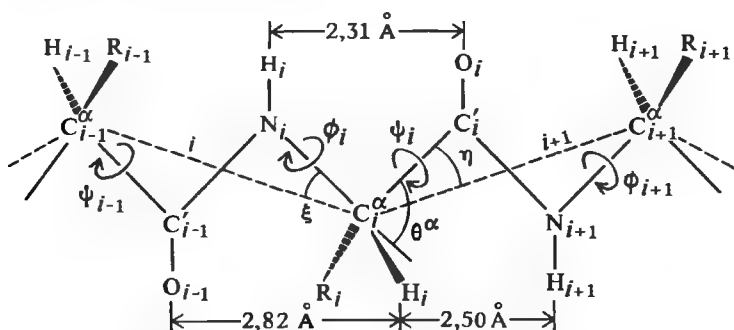


РИС. 18.12. Схематическое изображение полипептидного остова в плоской зигзагообразной форме. Виртуальные связи i и $i+1$ изображены пунктирными прямыми. Указаны фиксированные геометрические параметры и изменяющиеся углы вращения ϕ и ψ . Угол θ^α является дополнительным к углу $N_i-C_i^\alpha-C_i'$; через η обозначен угол между $(i+1)$ -й виртуальной связью и связью $C_i^\alpha-C_i'$; через ξ — угол между i -й виртуальной связью и связью $N_i-C_i^\alpha$. (Flory P. J., Statistical Mechanics of Chain Molecules, 1969, p. 251.)

Как отмечалось в гл. 5, расстояние между соседними α -углеродными атомами фиксировано и равно $3,8 \text{ \AA}$, что обусловлено плоской *транс*-конформацией амидной группы. Таким образом, при вычислении внутрицепочечных расстояний полипептид может быть представлен как последовательность виртуальных связей, соединяющих соседние атомы C_i^α . Эти виртуальные связи изображены пунктирными прямыми на рис. 18.12. Цепь из $(n + 1)$ остатка имеет n таких связей, которые последовательно проходят от атома C_0^α до атома C_n^α . В этой схеме концами цепи следует считать атомы C_0^α и C_n^α , а не амино- и карбоксильную группы.

● ВЫЧИСЛЕНИЕ $\langle r^2 \rangle_0$ В МОДЕЛИ ВИРТУАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ

Средний квадрат расстояния между концами невозмущенной цепи вычисляется по формуле (18.4), где $\hat{l}_i$ теперь соответствует вектору i -й виртуальной связи. Для вычисления $\langle r^2 \rangle_0$ необходимо произвести усреднение по всем конфигурациям изменением каждого угла ϕ_i и ψ_i . При изменении этих углов вращения меняются ориентации виртуальных связей. В частности, взаимная ориентация $\hat{l}_{i+1}$ и $\hat{l}_i$ определяется углами ϕ_i и ψ_i .

Для вычисления $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle$ используется функция конформационной энергии, рассмотренная в гл. 5. В этой главе было показано, что повороты ϕ_i и ψ_i в i -й единице в хорошем приближении не зависят от поворотов в соседних единицах, что обусловлено *транс*-конформацией амидных групп. Препятствия, возникающие при поворотах ϕ_i , ψ_i , можно представить энергетическими диаграммами, такими, как изображенные на рис. 5.7 и 5.8. (Поскольку здесь используются иные соглашения относительно состояний, соответствующих $\phi_i = 0^\circ$ и $\psi_i = 0^\circ$, диаграммы конформационной энергии на рис. 5.3, 5.4, 5.7, 5.8, 5.10, 5.11, 5.12 должны быть переопределены как по ординате, так и по абсциссе прибавлением 180° к указанным вдоль осей значениям.) Конформационная энергия цепи как целого, $E(\phi_1, \psi_1, \phi_2, \psi_2, \dots)$, может быть записана в виде суммы вкладов E_i , связанных с поворотами в пределах каждого остатка:

$$E(\phi_1, \psi_1, \phi_2, \psi_2, \dots) = E_1(\phi_1, \psi_1) + E_2(\phi_2, \psi_2) + \dots + E_{n-1}(\phi_{n-1}, \psi_{n-1}) \quad (18.32)$$

[Энергии $E_0(\phi_0, \psi_0)$ и $E_n(\phi_n, \psi_n)$ не представляют интереса, поскольку значения углов ϕ_0 , ψ_0 и ϕ_n , ψ_n не влияют на расстояние между концевыми α -углеродными атомами.] Независимость поворотов в отдельных остатках значительно упрощает вычисление суммы

$\sum_{j>i} \langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle$ по формулам (18.5) и (18.6). Тем не менее величину $\hat{l}_i \cdot \hat{l}_j$ вычислить для поли-

пептидной цепи труднее, чем для свободно-сочлененной цепи или цепи со свободным вращением. Искомую величину можно найти с помощью процедуры, которую мы опишем ниже.

● СИСТЕМА КООРДИНАТ ДЛЯ КАЖДОЙ СВЯЗИ

Система координат x_i, y_i, z_i определяется для каждой i -й связи; мы будем иногда говорить о ней как об i -й системе координат. Каждая i -связь задается в этой системе вектором $\hat{l}_i$. Однако скаляр $\hat{l}_i \cdot \hat{l}_j$ может быть вычислен только в том случае, если и $\hat{l}_i$, и $\hat{l}_j$ заданы в одной и той же системе координат. Для этого нужно преобразовать j -ю систему координат в i -ю. Такие преобразования выполняются с помощью матриц, и при последующем рассмотрении мы будем ориентироваться на читателя, хотя бы немного знакомого с матричными методами (см. Приложение А, в котором дано краткое введение в матричную алгебру).

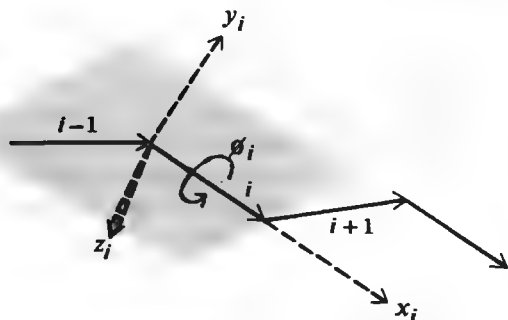


РИС. 18.13. Расположение декартовой системы координат, связанной с i -й связью, в гипотетической цепи.

На рис. 18.13 изображена декартова система координат x_i, y_i, z_i для i -й связи (длины l_i), реальной или виртуальной. Ось x_i направлена вдоль этой связи. Ось y_i расположена в плоскости связей $i-1$ и i ; она ориентирована таким образом, что проекции точек $i-1$ и i на эту ось оказываются положительными. Ось z_i выбрана так, чтобы получилась правая система координат. Заметим, что при этих условиях для плоской зигзагообразной конформации цепи оси z_i в соседних системах координат будут направлены в противоположные стороны от плоскости, в которой лежит цепь. Важно также отметить, что выбор оси x_i вдоль направления $\hat{l}_i$ означает, что вектор-столбец, определяющий положение каждого $\hat{l}_i$ в i -й системе координат, имеет вид

$$\hat{l}_i = \begin{pmatrix} l_i \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = l_i \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{для } i = 1, 2, \dots, n \quad (18.33)$$

где l_i , 0 и 0 являются соответственно компонентами x_i , y_i и z_i вектора $\hat{l}_i$.

Когда $\hat{l}_i$ и $\hat{l}_j$ заданы в одной и той же системе координат, их скалярное произведение можно записать как $\hat{l}_i^T \cdot \hat{l}_j$, где $\hat{l}_i^T$ соответствует транспонированной, или строчной, форме $\hat{l}_i$. Это произведение равно

$$(l_{ix}, l_{iy}, l_{iz}) \begin{pmatrix} l_{jx} \\ l_{jy} \\ l_{jz} \end{pmatrix} = l_{ix}l_{jx} + l_{iy}l_{jy} + l_{iz}l_{jz} \quad (18.34)$$

где l_{ix} , l_{iy} и l_{iz} — это компоненты вектора $\hat{l}_i$ в общей для двух векторов системе координат, а l_{jx} , l_{jy} и l_{jz} — компоненты $\hat{l}_j$ в этой системе. Обычно система координат x_i, y_i, z_i (i -я система координат) выбирается в качестве общей и вектор $\hat{l}_j$ переводится в эту систему.

● ПРЕОБРАЗОВАНИЕ МАТРИЦ

Рассмотрим теперь преобразование представления вектора в одной системе координат к представлению в другой системе. Точная связь между системами $x_{i+1}, y_{i+1}, z_{i+1}$ и x_i, y_i, z_i , например, зависит от фиксированных параметров ξ , η и θ^a и от переменных ϕ_i и ψ_i (рис. 18.12). Поскольку ϕ_i и ψ_i изменяются, меняется и связь между осями двух систем координат. Обозначим через $\underline{T}_i(\phi_i, \psi_i)$ матрицу, которая преобразует представление вектора в системе координат $x_{i+1}, y_{i+1}, z_{i+1}$ в его представление в системе x_i, y_i, z_i ; ясно, что эта матрица зависит от переменных ϕ_i и ψ_i . Подробный вывод выражения для матрицы $\underline{T}_i$ дан в

разд. 18.7. Сейчас же мы просто отметим, что $\underline{T}_i$ является матрицей размером 3×3 , и проведем наши вычисления $\langle r^2 \rangle_0$.

Представление $\hat{\mathbf{l}}_{i+1}$ в системе $x_i y_i z_i$ дается произведением $\underline{T}_i \hat{\mathbf{l}}_{i+1}$. Представление $\hat{\mathbf{l}}_{i+1}$ в системе $x_{i-1} y_{i-1} z_{i-1}$ получается как $\underline{T}_{i-1} (\underline{T}_i \hat{\mathbf{l}}_{i+1}) = \underline{T}_{i-1} \underline{T}_i \hat{\mathbf{l}}_{i+1}$. В общем случае представление $\hat{\mathbf{l}}_i$ в $x_i y_i z_i$ получается как $\underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1} \hat{\mathbf{l}}_j$. Поэтому, так как искомое преобразование можно представить как перемножение матриц, $\hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j$ вычисляется как

$$\hat{\mathbf{l}}_i \underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1} \hat{\mathbf{l}}_j = l^2 (1, 0, 0) \underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (18.35)$$

где l было вынесено из $\hat{\mathbf{l}}_i$ и $\hat{\mathbf{l}}_j$. Уравнение (18.35) идентично уравнению (18.34). В уравнении (18.34) $\hat{\mathbf{l}}_j$ задан в общей для двух векторов системе координат и имеет компоненты l_{jx}, l_{jy}, l_{jz} ; в уравнении (18.35) $\hat{\mathbf{l}}_j$ задан в своей, j -й системе координат, имеет компоненты $l, 0, 0$ и преобразуется умножением на $\underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1}$ в i -ю систему координат; таким образом, i -я система и является общей системой координат в этом примере.

● ПРОИЗВЕДЕНИЕ УСРЕДНЕННЫХ МАТРИЦ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ

Теперь мы можем прямо вычислить $\langle \hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j \rangle$. В соответствии с уравнением (18.35) мы имеем

$$\langle \hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j \rangle = l^2 \mathbf{e}^T \langle \underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1} \rangle \mathbf{e} \quad (18.36)$$

где $\mathbf{e}^T = (1, 0, 0)$. Среднее от произведения матриц равно

$$\begin{aligned} & \langle \underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1} \rangle \\ &= \frac{\int_0^{2\pi} \dots \int_0^{2\pi} \underline{T}_i \dots \underline{T}_{j-1} \exp[-(E_i + \dots + E_{j-1})/kT] d\phi_i d\psi_i \dots d\phi_{j-1} d\psi_{j-1}}{\int_0^{2\pi} \dots \int_0^{2\pi} \exp[-(E_i + \dots + E_{j-1})/kT] d\phi_i d\psi_i \dots d\phi_{j-1} d\psi_{j-1}} \end{aligned} \quad (18.37)$$

где $E_i = E_i(\phi_i, \psi_i)$, $E_{i+1} = E_{i+1}(\phi_{i+1}, \psi_{i+1})$ и т.д.

Из этого выражения видно, что повороты ϕ_k, ψ_k в пределах одного остатка не зависят от поворотов в соседних остатках. Каждое двойное интегрирование по $d\phi_k d\psi_k$ может быть выполнено независимо, потому что полная энергия равна простой сумме членов $E_k(\phi_k, \psi_k)$, а матрица $\underline{T}_k$ является функцией только ϕ_k и ψ_k . Более того, поскольку $\exp(A + B + C + \dots) = e^A e^B e^C \dots$, уравнение (18.37) можно упростить:

$$\begin{aligned} & \langle \underline{T}_i \underline{T}_{i+1} \dots \underline{T}_{j-1} \rangle \\ &= \frac{\left(\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \underline{T}_i \exp\left(\frac{-E_i}{kT}\right) d\phi_i d\psi_i \right) \dots \left(\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \underline{T}_{j-1} \exp\left(\frac{-E_{j-1}}{kT}\right) d\phi_{j-1} d\psi_{j-1} \right)}{\left(\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp\left(\frac{-E_i}{kT}\right) d\phi_i d\psi_i \right) \dots \left(\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp\left(\frac{-E_{j-1}}{kT}\right) d\phi_{j-1} d\psi_{j-1} \right)} \end{aligned} \quad (18.38)$$

$$= \langle \underline{\mathbf{T}}_i \rangle \langle \underline{\mathbf{T}}_{i+1} \rangle \cdots \langle \underline{\mathbf{T}}_{j-1} \rangle \quad (18.39)$$

где снова $E_k = E_k(\phi_k, \psi_k)$ и

$$\langle \underline{\mathbf{T}}_k \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \underline{\mathbf{T}}_k \exp(-E_k/kT) d\phi_k d\psi_k}{\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp(-E_k/kT) d\phi_k d\psi_k} \quad (18.40)$$

Тот факт, что среднее от произведения матриц равно произведению усредненных матриц, значительно упрощает все вычисления. Важно иметь в виду и то обстоятельство, что $\langle \underline{\mathbf{T}}_k \rangle$ зависит только от природы k -й аминокислоты, поскольку E_k является функцией только углов ϕ_k и ψ_k , относящихся к k -му остатку. Сравните для примера различные потенциальные функции, которые описывают повороты в глициловом и аланиловом остатках (рис. 5.7 и 5.8). Поэтому при вычислении среднего квадрата расстояния между концами каждый аминокислотный остаток имеет определенное матричное представление, которое является усредненной матрицей преобразования. Величины $\langle \underline{\mathbf{T}}_k \rangle$ могут быть вычислены в поворотно-изомерном приближении путем учета только дискретных состояний ϕ_k, ψ_k (например, для остатков глицила и аланила эти состояния соответствуют локальным минимумам на энергетических диаграммах, изображенных на рис. 5.7 и 5.8) или могут быть оценены численным интегрированием по более широкой области.

● СУММИРОВАНИЕ ПРОИЗВЕДЕНИЯ МАТРИЦ

Для завершения нашего вычисления $\langle r^2 \rangle_0$ по формуле (18.4) рассмотрим (для простоты) случай гомополимера, в котором все аминокислотные остатки идентичны. В этом случае

$$\langle \underline{\mathbf{T}}_i \rangle \langle \underline{\mathbf{T}}_{i+1} \rangle \cdots \langle \underline{\mathbf{T}}_{j-1} \rangle = \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle^{j-i} \quad (18.41)$$

где $\langle \underline{\mathbf{T}} \rangle$ является усредненной матрицей преобразования для рассматриваемой аминокислоты. Поэтому мы получаем

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2l^2 \sum_{j>i} \mathbf{e}^T \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle^{j-i} \mathbf{e} \quad (18.42)$$

В выражении (18.42) имеется $n - k$ слагаемых для каждого $j - i = k$, поэтому его можно упростить, сгруппировав подобные члены:

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2l^2 \sum_{k=1}^{n-1} (n - k) \mathbf{e}^T \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle^k \mathbf{e} \quad (18.43)$$

Формула (18.43) совершенно аналогична (18.26). Вместо скаляра α^k в ней появляется $\langle \underline{\mathbf{T}} \rangle^k$. Матрицы можно складывать так же, как скалярные величины. Заменяя α на $\langle \underline{\mathbf{T}} \rangle$ в (18.28), мы получим результат, соответствующий суммированию в (18.43):

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 \mathbf{e}^T \underline{\mathbf{H}} \mathbf{e} \quad (18.44)$$

где

$$= nl^2 H_{11} \quad (18.45)$$

$$\underline{\mathbf{H}} = (\underline{\mathbf{I}} + \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle)(\underline{\mathbf{I}} - \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle)^{-1} - (2\langle \underline{\mathbf{T}} \rangle/n)[(\underline{\mathbf{I}} - \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle)^n(\underline{\mathbf{I}} - \langle \underline{\mathbf{T}} \rangle)^{-2}] \quad (18.46)$$

В соотношении (18.46) показатель степени -1 означает, что берется матрица, обратная

данной, показатель -2 соответствует возведению в квадрат обратной матрицы, а $\underline{I}$ является единичной матрицей:

$$\underline{I} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Параметр H_{11} в (18.45) является элементом первой строки и первого столбца матрицы $\underline{H}$. Только этот элемент входит в выражение для $\langle r^2 \rangle_0$, поскольку $\mathbf{e}^T \underline{H} \mathbf{e} = H_{11}$.

Рассмотрение, приведшее к формулам (18.44)—(18.46), ярко иллюстрирует эффективность матричных методов при выполнении сложных конформационных расчетов для реальных цепей. Эти методы могут быть использованы и при анализе значительно более сложных ситуаций. В следующем разделе мы выведем выражение для матрицы преобразования $\underline{T}$. Основываясь на этом выводе, мы рассмотрим результаты конформационных расчетов для полипептидов и их применение к анализу структуры белков.

● 18.7. Нахождение матрицы преобразования координат

Нахождение матрицы преобразования координат является необходимым этапом при любом строгом анализе реальных цепей. Задача состоит в том, чтобы выразить вектор $\mathbf{v}$ через его компоненты в i -й системе координат, если мы знаем эти компоненты в $i + 1$ -й системе и найти связь между системами i и $(i + 1)$. Пусть вектор $\mathbf{v}$ в $(i + 1)$ -й системе координат задан соотношением

$$\mathbf{v} = \hat{\mathbf{i}}_{i+1} v_x + \hat{\mathbf{j}}_{i+1} v_y + \hat{\mathbf{k}}_{i+1} v_z \quad (18.47)$$

где индекс $i + 1$ соответствует номеру системы координат. В системе i вектор $\mathbf{v}$ можно записать как

$$\mathbf{v} = \hat{\mathbf{i}}_i v'_x + \hat{\mathbf{j}}_i v'_y + \hat{\mathbf{k}}_i v'_z \quad (18.48)$$

где величины со штрихами должны быть вычислены. Вектор $\mathbf{v}$ можно записать в виде вектора-столбца в $(i + 1)$ -й системе координат:

$$\mathbf{v} = \begin{pmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{pmatrix} \quad (18.49)$$

Пусть элементы R_{11} , R_{21} и R_{31} являются i -й, j -й и k -й компонентами единичного вектора $\hat{\mathbf{i}}_{i+1}$ соответственно¹. Они образуют вектор-столбец

$$\begin{pmatrix} R_{11} \\ R_{21} \\ R_{31} \end{pmatrix}$$

¹ Следует все время помнить, что $\hat{\mathbf{i}}_{i+1}$ означает единичный вектор, направленный вдоль оси x $(i + 1)$ -й системы координат.

Аналогично i -я, j -я и k -я компоненты единичного вектора $\hat{j}_{i+1}$ есть

$$\begin{pmatrix} R_{12} \\ R_{22} \\ R_{32} \end{pmatrix}$$

а соответствующие компоненты вектора $\hat{k}_{i+1}$ —

$$\begin{pmatrix} R_{13} \\ R_{23} \\ R_{33} \end{pmatrix}$$

Это означает, что матрица $\mathbf{R}$ преобразует компоненты вектора $\mathbf{v}$ из системы $(i + 1)$ в систему i , причем $\mathbf{R}$ равна

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} R_{11} & R_{12} & R_{13} \\ R_{21} & R_{22} & R_{23} \\ R_{31} & R_{32} & R_{33} \end{pmatrix} \quad (18.50)$$

и преобразование выражается как

$$\begin{pmatrix} v'_x \\ v'_y \\ v'_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} R_{11} & R_{12} & R_{13} \\ R_{21} & R_{22} & R_{23} \\ R_{31} & R_{32} & R_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{pmatrix} \quad (18.51)$$

$$= \begin{pmatrix} R_{11}v_x + R_{12}v_y + R_{13}v_z \\ R_{21}v_x + R_{22}v_y + R_{23}v_z \\ R_{31}v_x + R_{32}v_y + R_{33}v_z \end{pmatrix} \quad (18.52)$$

Таким образом, согласно (18.52), $v'_x = R_{11}v_x + R_{12}v_y + R_{13}v_z$; аналогичные соотношения имеют место для v'_y и v'_z . Наша задача теперь состоит в том, чтобы найти матрицу преобразования $\mathbf{R}$.

Рис. 18.14 иллюстрирует связь между двумя правыми системами координат. Мы будем

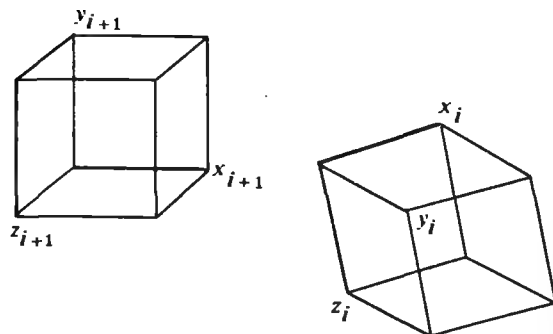


РИС. 18.14. Одна из возможных относительных ориентаций систем координат i и $i + 1$. Оси x_i , x_{i+1} и y_{i+1} лежат в плоскости рисунка, а ось y_i образует острый угол с этой плоскостью.

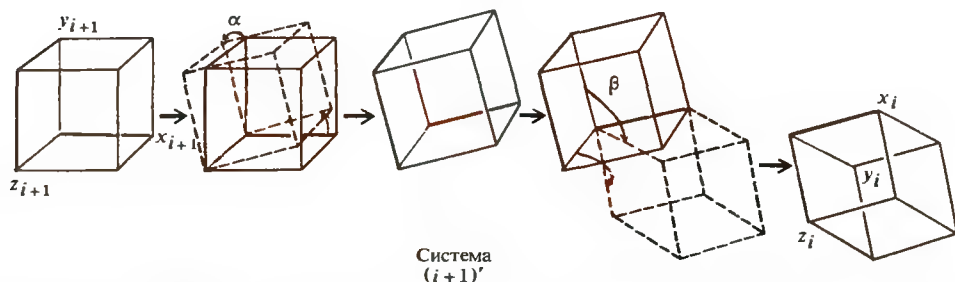


РИС. 18.15. Преобразование систем координат. Два поворота переводят систему координат $i + 1$ в систему i .

считать, что между двумя системами существует такое соотношение, что поворот $(i + 1)$ -й системы вокруг оси z_{i+1} на угол α приводит к совмещению осей x_{i+1} и x_i . Далее, поворот $(i + 1)$ -й системы вокруг общей оси x на угол β приводит к совмещению осей y и z (эти процедуры показаны на рис. 18.15, который следует внимательно изучить). Системы координат, связанные таким образом, как показано на рис. 18.15, играют очень большую роль для расчетов конформаций полимерных цепей.

Для того чтобы перейти от $(i + 1)$ -й системы координат к i -й системе, мы вначале преобразуем $(i + 1)$ -ю систему в $(i + 1)'$ -ю, получающуюся поворотом системы $(i + 1)$ на угол α вокруг оси z_{i+1} . Это преобразование задается матрицей $\underline{R}_1$. Матрица $\underline{R}_1$ переводит единичные векторы $\hat{i}_{i+1}, \hat{j}_{i+1}, \hat{k}_{i+1}$ в систему $(i + 1)'$. Вектор $\underline{R}_1 \mathbf{v}$, например, является вектором, представленным в системе координат $(i + 1)'$. Если $\underline{R}_2$ переводит систему координат $(i + 1)'$ в систему i , то $\underline{R}_2 \underline{R}_1 \mathbf{v}$ задает вектор $\mathbf{v}$ в системе координат i . Поэтому $\underline{R}_2 \underline{R}_1 = \underline{R}$. Читатель может легко проверить, что

$$\underline{R}_1 = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (18.53)$$

$$\underline{R}_2 = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \beta & \sin \beta \\ 0 & -\sin \beta & \cos \beta \end{pmatrix} \quad (18.54)$$

Напомним, что три элемента первого столбца матрицы $\underline{R}_1$ являются (сверху вниз) $i_{(i+1)'}, j_{(i+1)'}, k_{(i+1)'}$ -компонентами единичного вектора, ориентированного вдоль оси x_{i+1} . Аналогично $i_{(i+1)'}, j_{(i+1)'}, k_{(i+1)'}$ -компонентами единичного вектора, направленного вдоль оси y_{i+1} , являются элементы второго столбца. Например, $\hat{i}_{i+1}$ имеет компоненту $\cos \alpha$ по оси $x_{(i+1)'}$ и компоненту $-\sin \alpha$ по оси $y_{(i+1)'}$.

Матрица $\underline{R} = \underline{R}_2 \underline{R}_1$ равна

$$\underline{R}(\alpha, \beta) = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\cos \beta \sin \alpha & \cos \beta \cos \alpha & \sin \beta \\ \sin \beta \sin \alpha & -\sin \beta \cos \alpha & \cos \beta \end{pmatrix} \quad (18.55)$$

Уравнение (18.55) дает искомую матрицу преобразования $\underline{R}$, которая переводит систему координат $(i + 1)$ в систему i .

● ПРЕОБРАЗОВАНИЕ МЕЖДУ СИСТЕМАМИ КООРДИНАТ ДЛЯ ВИРТУАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ

Для дальнейшего анализа необходимо преобразовать координатную систему виртуальной связи $(i + 1)$ в систему i -й виртуальной связи (см. рис. 18.12). Системы координат для виртуальных связей вводятся таким же образом, как и для реальных связей (см. разд. 18.6). Искомое преобразование выполняется в три этапа: перевод системы $(i + 1)$ -й виртуальной связи в систему связи $C_i^\alpha - C_i$, затем перевод в систему связи $N_i - C_i^\alpha$ и, наконец, преобразование к системе i -й виртуальной связи. Чтобы совместить систему координат $(i + 1)$ -й виртуальной связи с системой связи $C_i^\alpha - C_i$, ее нужно повернуть на углы $-\eta$ и $-\psi^1$. Это преобразование описывает матрица $\underline{R}(-\eta, -\psi_i)$. Следующее преобразование к системе связи $N_i - C_i^\alpha$ осуществляется с помощью матрицы $\underline{R}[\theta^\alpha, (\pi - \phi_i)]$, а последнее преобразование к системе координат i -й виртуальной связи выполняется с помощью матрицы $\underline{R}(\xi, 0)$. Следовательно, матрица $\underline{T}_i(\phi_i, \psi_i)$, которая осуществляет переход от $(i + 1)$ -й к i -й системе, равна

$$\underline{T}_i(\phi_i, \psi_i) = \underline{R}(\xi, 0)\underline{R}[\theta^\alpha, (\pi - \phi_i)]\underline{R}(-\eta, -\psi_i) \quad (18.56)$$

Это и есть та матрица, которая используется при статистическом анализе полипептидных цепей, описанном выше [формула (18.35) и следующие].

● УСРЕДНЕННЫЕ МАТРИЦЫ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ДЛЯ ГЛИЦИНА И L-АЛАНИНА

В качестве иллюстрации интересно получить усредненные матрицы преобразования для глицилового и L-аланинового остатков, входящих в состав полипептидной цепи. Эти матрицы находятся по формуле (18.40) с использованием энергетических потенциалов, изображенных на рис. 5.7 и 5.8, и имеют вид

$$\langle \underline{T}_{\text{Gly}} \rangle = \begin{pmatrix} 0,36 & -0,077 & 0 \\ -0,092 & -0,037 & 0 \\ 0 & 0 & -0,12 \end{pmatrix} \quad (18.57)$$

$$\langle \underline{T}_{\text{Ala}} \rangle = \begin{pmatrix} 0,51 & 0,20 & 0,59 \\ -0,046 & -0,61 & 0,21 \\ 0,65 & -0,23 & 0,30 \end{pmatrix} \quad (18.58)$$

Симметрия глицилового остатка приводит к появлению у $\langle \underline{T}_{\text{Gly}} \rangle$ четырех нулевых элементов. Эти матрицы используются при конфигурационных расчетах параметров гомополимеров полиглицина и поли-L-аланина в соответствии с формулами (18.44)–(18.46). Они применимы также и для анализа свойств полипептидных сополимеров.

¹ Применительно к (18.55) это означает, что $\alpha = -\eta$ и $\beta = -\psi$. Например, напомним, что α соответствует углу, на который должна быть повернута ось x системы $(i + 1)$ -й виртуальной связи для совмещения с осью x координатной системы связи $C_i^\alpha - C_i$. Этот поворот является правым и совершается вокруг оси z системы $(i + 1)$ -й виртуальной связи. Анализ рис. 18.12 показывает, что для совмещения осей x системы $(i + 1)$ -й связи и системы связи $C_i^\alpha - C_i$ необходим поворот на угол $-\eta$.

18.8. Результаты конформационных расчетов параметров полипептидов

К настоящему времени выполнено много интересных расчетов параметров, характеризующих полипептидные молекулы. Они позволили достаточно глубоко понять конформационные свойства клубкообразных состояний этих важных полимеров и сделать некоторые выводы относительно сворачивания белковых цепей.

В табл. 18.1 приведены предельные значения характеристических отношений $C_\infty = (\langle r^2 \rangle_0 / nl^2)_{n \rightarrow \infty}$ для полиглицина, поли-L-аланина, поли-L-пролина (у которого угол поворота ϕ фиксирован из-за наличия пирролидинового кольца) и поли-(L-молочной кислоты). Последняя является полипептидоподобной цепью, в которой амидное звено заменено на эфирное. Вычисления, результаты которых приведены в табл. 18.1, были выполнены по описанной выше схеме [см. (18.44)—(18.46)]. Заметим, что при $n \rightarrow \infty$ формула (18.46) значительно упрощается. В таблице приведены результаты расчетов, выполненных в предположении о свободном вращении в каждом из углов ϕ_i и ψ_i (в поли-L-пролине — только для угла ψ_i) и для случаев, когда в функцию $E_i(\phi_i, \psi_i)$, используемую для нахождения $\langle T \rangle$, не входит или, напротив, включена энергия диполь-дипольного взаимодействия E_d между диполями соседних амидных групп (см. гл. 5). В табл. 18.1 приведены также два экспериментально полученных значения C_∞ .

ДИПОЛЬ-ДИПОЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ АМИДНЫМИ ГРУППАМИ

Из табл. 18.1 видно, что согласие между теорией и экспериментом является удовлетворительным лишь в том случае, когда при расчетах учитывается энергия E_d . Этот факт подчеркивает значение диполь-дипольного взаимодействия в формировании конформаций полипептидов. В случае поли-L-аланина рассчитанные среднеквадратичные размеры увеличиваются при учете энергии E_d более чем втрое. Этот результат становится понятен, если обратиться к энергетической диаграмме для остатка L-аланина (рис. 5.8). Без учета диполь-дипольного взаимодействия наиболее предпочтительные конформации лежат как в области I, так и в области III. Однако за счет диполь-дипольного взаимодействия область III получает определенное преимущество, так что у следующих друг за другом остатков проявляется тенденция к локализации углов ϕ и ψ именно в этой области.

Таблица 18.1

 ПРЕДЕЛЬНОЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОЕ ОТНОШЕНИЕ C_∞ ¹⁾

Полимер	Свободное вращение	Без учета диполь-дипольного взаимодействия	С учетом диполь-дипольного взаимодействия	Экспериментальные значения
Полиглицин	1,93	1,79	2,16	—
Поли-L-аланин	1,93	2,97	9,27	9,0
Поли-L-пролин II	1,86	116	—	—
Поли-(L-молочная кислота)	1,92	1,24	2,13	2,1

¹⁾Flory P. J. Statistical Mechanics of Chain Molecules, New York, Wiley, 1969, p. 277.

Вследствие этого траектория, которую описывает цепь, в большей степени следует заданному начальными звеньями направлению и имеет меньше изгибов или поворотов, которые происходили бы при значениях ϕ и ψ , лежащих в других областях (таких как область I).

РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ ПОЛИМЕРАМИ, СОСТОЯЩИМИ ИЗ ОСТАТКОВ ГЛИЦИНА, L-АЛАНИНА И L-ПРОЛИНА

Размеры цепи полиглицина оказываются значительно меньше, чем для поли-L-аланина, что указывает на преобладание в первом полимере более компактных конформаций. Действительно, близкие размеры дает модель полиглициновой цепи со свободным вращением, хотя в реальной цепи, без сомнения, разрешены далеко не любые значения углов ϕ и ψ (см. рис. 5.7). Влияние энергии диполь-дипольного взаимодействия E_d в этом случае незначительно. Эти результаты являются следствием существования двух симметрично расположенных минимумов энергии $E(\phi, \psi)$, что связано с симметрией глицилового остатка (см. рис. 5.7). Это означает, что следующие друг за другом остатки в цепи могут принимать как ту, так и другую альтернативную конфигурацию, повышая таким образом долю сильно изогнутых конфигураций цепи.

Особым случаем является поли-L-пролин II¹⁾, для остатков которого повороты с изменением ψ полностью запрещены. В результате этот полимер представляет собой очень

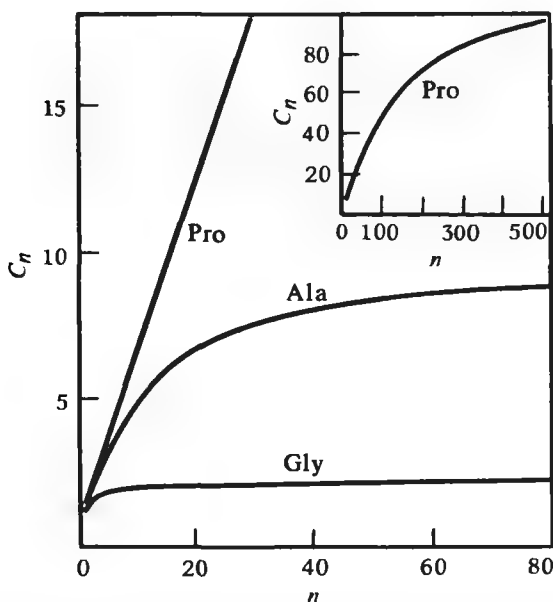


РИС. 18.16. Характеристическое отношение для различных гомополипептидов. Зависимость характеристического отношения C_n от n для полиглицина, поли-L-аланина и поли-L-пролина. (Schimmel P. R., Flory P. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 52, 1967.)

¹⁾ В форме II все амидные звенья находятся в *транс*-конфигурации, а в форме I все они имеют *цис*-конфигурацию (см. гл. 20).

жесткую цепь больших размеров. (Влияние E_d на размеры цепи не оценивалось количественно, но оно, по-видимому, невелико.) Действительно, для коротких цепей размеры клубка оказываются близки к размерам спирали поли-L-пролина II, которая была обстоятельно исследована.

Рис. 18.16 иллюстрирует дальнейшие различия конформационных характеристик полиглицина, поли-L-аланина и поли-L-пролина. На рисунке приведен график зависимости C_n от n . Видно, что скорость приближения этого безразмерного отношения к его асимптотическому значению существенно различна для этих трех полимеров. Быстрее всех достигает своего асимптотического значения C_n для полиглицина, тогда как в случае поли-L-пролина оно выходит на асимптоту очень медленно. Это отражает различие в жесткости цепей. Напомним, что в случае свободно-сочлененной цепи C_n не зависит от n для всех n [см. формулу (18.10)]. Поэтому, когда C_n перестает зависеть от n , поведение реальной цепи (в этом предельном случае) приближается к поведению свободно-сочлененной. (Заметим, что C_n для реальных цепей в отличие от свободно-сочлененной цепи не стремится к единице; дальнейшие разъяснения см. в разд. 18.9.)

Таблица 18.2

 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И РАСЧЕТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ВНУТРИЦЕПОЧНЫХ РАССТОЯНИЙ¹⁾

Полипептид	Число амино- кислот- ных остат- ков	Среднеквадратичное расстояние между концами, Å		Экспериментальный метод
		экспери- мент	расчет	
Поли-L-лизин	550 ²⁾	260 ³⁾	271,4 ⁴⁾	Вязкость
Поли-β-бензил- L-аспартат	912 ²⁾	360 ³⁾	349,4 ⁴⁾	"
Поли-γ-бензил- L-глутамат	1534 ²⁾	440 ⁵⁾	453,2 ⁴⁾	Вязкость, рассеяние света
Полиглицин	3	7,8 ⁶⁾	7,9 ⁷⁾	Диэлектрическая про- ницаемость
Полиглицин	7	12,1 ⁶⁾	12,0 ⁷⁾	То же
Поли-L-пролин	7	20 ⁸⁾	18,5 ⁹⁾	Спектроскопия — перенос энергии
Поли-L-пролин	12	34 ⁸⁾	33,4 ⁹⁾	То же

¹⁾Для всех высокомолекулярных образцов в экспериментальные величины были внесены поправки на эффект исключенного объема.

²⁾Среднее число остатков.

³⁾Brant D. A., Flory P. J., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2788 (1965).

⁴⁾Brant D. A., Flory P. J., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2791 (1965).

⁵⁾Doty P., Bradbury J. H., Holtzer A. M., J. Am. Chem. Soc., **78**, 947 (1956).

⁶⁾Edsall J. T., Wyman J., Biophysical Chemistry, vol. 1, New York, Academic Press, 1958, p. 372.

⁷⁾Flory P. J., Schimmel P. R., J. Am. Chem. Soc., **89**, 6807 (1967).

⁸⁾Stryer L., Haugland R. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 719 (1967).

⁹⁾Schimmel P. R., Flory P. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 52 (1967).

[Для полипролина экспериментальные величины соответствуют $\langle r^2 \rangle^{1/6}$, что, однако, для коротких жестких олигомеров пролина близко к $\langle r^2 \rangle^{1/2}$.]

СРАВНЕНИЕ РАСЧЕТНЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

В табл. 18.2 приведены рассчитанные и экспериментальные значения $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ для многих полипептидов. Молекулярные массы рассмотренных полипептидных пепей лежат в широком диапазоне. Как видно из таблицы, согласие между теоретическими и наблюдаемыми значениями $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ является очень хорошим для всей области n от 3 до 1500. Отметим большое различие в $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ для полиглицина и поли-L-пролина при $n = 7$. При вычислениях для поли-L-лизина, поли-β-бензил-L-аспартата, поли-γ-бензил-L-глутамата были использованы энергетические потенциалы для остатка L-аланила. Это вполне допустимо, как свидетельствуют приведенные в таблице результаты, поскольку препятствия для поворотов ϕ и ψ в основном совпадают для всех остатков с неразветвленными боковыми цепями или с цепями, у которых ветвление начинается за атомом β-углерода (см. гл. 5).

СОПОЛИМЕРЫ ПОЛИПЕПТИДОВ

Описанные выше результаты расчетов показывают, что конформация полипептидных гомополимеров сильно зависит от природы боковой цепи. Это означает, что можно получить широкий спектр средних размеров цепей простым изменением аминокислотного состава сополимера. Поэтому интересно исследовать точное соотношение между размерами полипептидного сополимера и его аминокислотным составом.

Этот вопрос был рассмотрен для нескольких сополимеров. На рис. 18.17 приведен график зависимости C_∞ от содержания остатков глицина или L-аланина для случайного сополимера глицина и L-аланина. Из рисунка видно, что введение небольшого количества остатков глицина в поли-L-аланиновую цепь приводит к непропорционально большому уменьшению ее размеров. Экспериментальные результаты согласуются с этим теоретическим предсказанием. Причина такого поведения состоит в том, что остатки глицина обладают более широким спектром конформаций, и гибкость жесткой поли-L-аланиновой цепи в тех точках, в которые введены остатки глицила, увеличивается. Это приводит к образованию более компактных конформаций цепи. Поэтому присутствие в белке даже малого количества остатков глицина может быть очень важно для образования компактной свернутой формы. Интересные выводы были сделаны и при изучении других сополимеров.

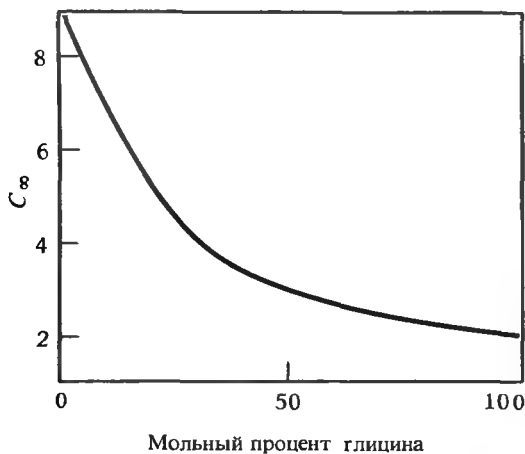


РИС. 18.17. Зависимость предельного характеристического отношения от содержания глицина в сополимере L-аланина и глицина со случайной последовательностью. (Miller W. G., Brant D. A., Flory P. J., J. Mol. Biol., 23, 67 1967.)

Результаты расчетов параметров полипептидных цепей иллюстрируют эффективность матричного метода и возможность теоретического объяснения экспериментальных данных. Эти исследования позволили значительно глубже понять природу тех факторов, которые играют важную роль в определении конформаций полипептидов и белков. Они, однако, не могут разрешить проблему предсказания уникальной нативной конформации белка по заданной аминокислотной последовательности. Обсуждение трудностей, возникающих при рассмотрении этой проблемы, можно найти в гл. 5.

18.9. Статистический сегмент

Для всех клубкообразных реальных цепей отношение $\langle r^2 \rangle_0 / nl^2$ стремится к постоянной величине C_∞ при $n \rightarrow \infty$. Это ясно видно из графика зависимости C_n от n для трех полипептидных цепей, приведенного на рис. 18.16. Как отмечалось выше, в том случае, когда C_n не зависит от n , полимер становится похож на свободно-сочлененную цепь, для которой C_n не зависит от n при всех n [см. формулу (18.10)]. Такое соотношение между $\langle r^2 \rangle_0$ и n для свободно-сочлененной цепи является следствием случайной ориентации каждой связи по отношению ко всем остальным связям; это выражает уравнение $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle = 0$ для всех $i \neq j$. В случае реальных цепей $\langle \hat{l}_i \cdot \hat{l}_j \rangle \rightarrow 0$ для больших $|i - j|$; это означает, что связи, достаточно удаленные друг от друга, оказываются ориентированными по отношению друг к другу случайным образом. Это дает основание для введения понятия «статистического сегмента» для реальных цепей. Идея состоит в том, что реальная цепь может быть приближенно представлена как цепь из свободно-сочлененных сегментов, каждый из которых случайно ориентирован по отношению ко всем остальным сегментам. Сегмент цепи должен быть выбран достаточно большим, чтобы выполнялось условие случайной ориентации. В этом приближении рассмотрение распределения конформаций свободно-сочлененной цепи становится применимым к реальным цепям, представляемым как полимеры, состоящие из статистических сегментов.

СВЯЗЬ МЕЖДУ СТАТИСТИЧЕСКИМ СЕГМЕНТОМ И РЕАЛЬНЫМИ СВЯЗЯМИ

Соотношение между длиной l_3 и числом N_3 статистических сегментов и длиной l и числом n действительных связей можно найти следующим образом. Когда величина $\langle r^2 \rangle_0 / nl^2$ достигает предельного значения C_∞ , выполняется соотношение

$$\langle r^2 \rangle_0 = C_\infty nl^2 \quad (18.59)$$

или, выраженное через эквивалентные статистические сегменты [ср. с (18.10)],

$$\langle r^2 \rangle_0 = N_3 l_3^2 \quad (18.60)$$

Для того чтобы найти N_3 и l_3 , требуется еще одно соотношение; оно может быть получено из условия, что максимальный размер цепи $r_{\max}$ равен

$$r_{\max} = N_3 l_3 \quad (18.61)$$

и

$$r_{\max} = fnl \quad (18.62)$$

Фактор f зависит от угла между связями в реальной цепи, поскольку для полностью вытянутой конфигурации (например, когда все звенья находятся в *транс*-конформации) векторы связей не параллельны прямой, соединяющей концы цепи. (Естественно, всегда $f \leq 1$. Если все углы, дополнительные к углам между связями, равны θ , $f = \cos(\theta/2)$ для четных

$n^1)$ Из соотношений (18.59)—(18.62) легко найти N_z и l_z :

$$N_z = (f^2/C_x)n \quad (18.63)$$

$$l_z = (C_x/f)l \quad (18.64)$$

Отметим, что l_z пропорционально C_∞ , в то время как N_z обратно пропорционально C_∞ . Поскольку величина C_∞ характеризует жесткость цепи, она и должна быть связана с l_z и N_z именно таким образом.

РАЗМЕРЫ СТАТИСТИЧЕСКИХ СЕГМЕНТОВ ДЛЯ РЕАЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ

В случае полиэтилена $f = 0,83$, а $C_\infty = 6,7$. Поэтому $N_z \cong 0,1n$, или $n/N_z = 10$, т.е. статистический сегмент состоит приблизительно из 10 реальных связей. Для полипептида из n виртуальных связей $f = 0,95$, а значение C_∞ зависит от природы боковой группы (см. табл. 18.1). n/N_z равно 2,4, 10,3 и 129 для полиглицина, поли-L-аланина и поли-L-пролина соответственно. Отвечающие им значения l_z составляют примерно 8,6, 37 и 460 Å.

Замечание. Тот факт, что реальную цепь можно представить как эквивалентную свободно-сочлененную цепь, подразумевает, что распределение расстояния между концами для реальной цепи описывается гауссовой функцией распределения с параметрами N_z и l_z , подставленными вместо n и l соответственно в параметр β формул (18.21) и (18.22). Важно помнить, однако, что гауссово представление цепи из эквивалентных статистических сегментов возможно только для очень больших n . Значительные отклонения от этой модели могут иметь место при не слишком больших n , даже когда длина цепи соответствует нескольким статистическим сегментам.

18.10. Персистентная длина

Другим полезным конфигурационным параметром является персистентная длина a . Она определяется как средняя проекция вектора $\mathbf{r}$, соединяющего концы цепи, на направление первой связи цепи $\hat{\mathbf{l}}_1$ в пределе бесконечно длинной цепи (рис. 18.18). Таким образом,

$$a = \left\langle (\hat{\mathbf{l}}_1/l_1) \cdot \sum_{i=1}^n \hat{\mathbf{l}}_i \right\rangle \quad \text{при } n \rightarrow \infty \quad (18.65)$$

где $\hat{\mathbf{l}}_1/l_1$ — единичный вектор, ориентированный в направлении $\hat{\mathbf{l}}_1$. Ясно, что персистентная длина является мерой расстояния, на котором цепь «сохраняет» то направление, которое задает первая связь. Для бесконечно длинной цепи персистентная длина, конечно, может быть измерена относительно любой связи $\hat{\mathbf{l}}_j$, достаточно удаленной от последней связи, так что a является просто суммой проекций всех связей при $j \geq i$ на $\hat{\mathbf{l}}_i/l_i$:

$$a = \left\langle (\hat{\mathbf{l}}_i/l_i) \cdot \sum_{j=i}^n \hat{\mathbf{l}}_j \right\rangle \quad \text{при } n \rightarrow \infty \quad (18.66)$$

¹⁾ Это легко показать. Рассмотрим цепь (при четном n) в полностью вытянутой зигзагообразной форме и соединим ее концы прямой линией. Проекция каждой связи на направление этой прямой равна $l \cos(\theta/2)$. Как вы думаете, почему для нечетных n выражение для f должно иметь несколько иной вид?

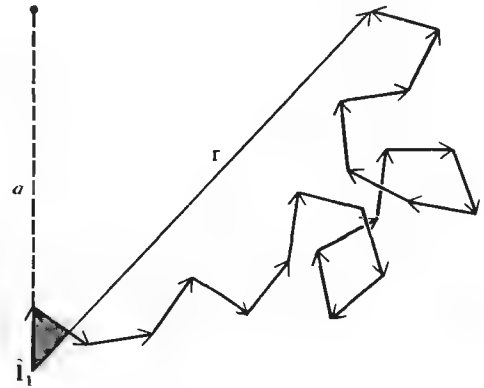


РИС. 18.18. Персистентная длина. Она определяется как средняя проекция вектора $\mathbf{r}$ на $\hat{\mathbf{l}}_1$ при $n \rightarrow \infty$. Показана одна конкретная конформация цепи; значение персистентной длины получается усреднением по всем конформациям [уравнение (18.65)].

Для цепей, состоящих из одинаковых связей длины l , легко показать, что персистентная длина прямо связана с предельным характеристическим отношением C_∞ . Это можно сделать, переписав выражение (18.4) в виде

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2 \left\langle \sum_{j=i+1}^n \sum_{i=1}^n (\hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j) \right\rangle \quad (18.67)$$

$$= nl^2 + 2 \left\langle \sum_{j=2}^n (\hat{\mathbf{l}}_1 \cdot \hat{\mathbf{l}}_j) \right\rangle + 2 \left\langle \sum_{j=i+1}^n \sum_{i=2}^n (\hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j) \right\rangle \quad (18.68)$$

При $n \rightarrow \infty$ первая сумма в (18.68) совпадает с суммой (18.65), за тем исключением, что i в (18.65) изменяется от 1 до n , а j в (18.68) пробегает значения от 2 до n . Поэтому при $n \rightarrow \infty$ первая сумма равна

$$\left\langle \sum_{j=2}^n (\hat{\mathbf{l}}_1 \cdot \hat{\mathbf{l}}_j) \right\rangle = al - \hat{\mathbf{l}}_1 \cdot \hat{\mathbf{l}}_1 = al - l^2 \quad (18.69)$$

Аналогичным образом, из (18.66) следует, что при каждом значении i во второй сумме в (18.68) суммирование по j дает $al - l^2$. Поэтому мы имеем

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2n(al - l^2) \quad \text{при } n \rightarrow \infty \quad (18.70)$$

$$= 2nla - nl^2 \quad (18.71)$$

Окончательно получаем

$$(\langle r^2 \rangle_0 / nl^2)_{n \rightarrow \infty} = C_\infty = 2a/l - 1 \quad (18.72)$$

и

$$a = (C_\infty + 1)l/2 \quad (18.73)$$

Это простое соотношение между a и C_∞ делает более ясным физический смысл предельного характеристического отношения. Для полипептидных цепей, перечисленных в табл. 18.1, a можно найти на основании приведенных значений C_∞ . Для полиглицина, поли-L-аланина и поли-L-пролина значение a равно приблизительно 6, 20 и 220 Å соответственно. Эти примеры иллюстрируют тесную связь между персистентной длиной и

«жесткостью» цепи и показывают, что персистентная длина является другой количественной мерой различий в гибкости полипептидных цепей.

18.11. Эффект исключенного объема и невозмущенное состояние

В приведенном выше рассмотрении статистики полимерных цепей мы не учитывали хорошо известные эффекты исключенного объема, полагая при расчетах параметров реальных цепей, что распределение по конформациям и, следовательно, расстояние между концами цепи зависят лишь от геометрии остова и препятствий для вращения в углах между связями. Препятствия для вращения возникают из-за близких взаимодействий между соседними группами в цепи. Дальние взаимодействия между удаленными вдоль последовательности элементами до сих пор нами не учитывались. Аналогично этому, не учитывались и взаимодействия между отдельными полимерными молекулами.

Влияние межмолекулярных взаимодействий можно уменьшить, используя достаточно разбавленные растворы. Внутримолекулярные эффекты, однако, при этом не уменьшаются. Главным среди них является эффект исключенного объема, возникающий из-за того, что два разных сегмента цепи не могут одновременно занимать один и тот же объем пространства. При построении всевозможных конформаций цепи для вычисления $\langle r^2 \rangle$ обнаруживается, что у многих из них имеются самопересечения при $n \rightarrow \infty$. Ясно, что такие конформации физически невозможны и должны быть исключены из рассмотрения.

Существуют условия, при которых эффекты исключенного объема оказываются незначительными, и их можно не учитывать. Рассмотрим, например, достаточно вытянутую жесткую клубкообразную цепь, такую, как поли-L-пролин. В этом случае для цепей длиной вплоть до 100 или немного более звеньев эффектами исключенного объема можно пренебречь. Для более гибких цепей, таких, как полиглицин, эти эффекты становятся заметными для значительно более коротких полимерных молекул. Однако эффект исключенного объема не оказывает заметного влияния на размеры цепей коротких олигомеров глицина, приведенные в табл. 18.2.

В настоящее время невозможно определить (для больших n) все те конформации цепи, которые должны быть исключены из рассмотрения из-за непроницаемости сегментов двух цепей. Необходим другой подход для сравнения вычисленных размеров (в которые не внесены поправки на исключенный объем) с экспериментальными результатами. Используемый для этого подход является достаточно прямым и основан на тщательном анализе существа проблемы.

КАЧЕСТВЕННОЕ РАССМОТРЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭФФЕКТА ИСКЛЮЧЕННОГО ОБЪЕМА НА РАЗМЕРЫ ЦЕПИ

Эффект исключенного объема изменяет размер цепи по сравнению с размерами невозмущенной цепи $\langle r^2 \rangle_0$ — величиной, о которой шла речь до сих пор. Невозмущенная цепь — это идеализированная модель, поскольку при вычислении $\langle r^2 \rangle_0$ учитываются и запрещенные из-за эффекта исключенного объема конфигурации. Однако существуют экспериментальные условия (см. ниже), при которых $\langle r^2 \rangle = \langle r^2 \rangle_0$, т.е. условия, когда эффекты исключенного объема в точности уравниваются другими факторами, и размеры невозмущенной цепи соответствуют экспериментальным. В этом смысле размеры невозмущенной цепи отвечают физической реальности.

Введем соотношение между размерами возмущенной и невозмущенной цепей (см. Flory, 1953):

$$\langle r^2 \rangle = \alpha^2 \langle r^2 \rangle_0 \quad (18.74)$$

Поскольку самопересечения цепи более вероятны в компактных конформациях, можно ожидать, что обычно $\alpha > 1$. Точное значение этого параметра зависит, однако, от молекулярной массы полимера и от растворителя. Влияние молекулярной массы становится очевидным, если учесть, что более длинные цепи имеют больше возможностей для самопересечений, чем более короткие. Поэтому α должно увеличиваться с увеличением молекулярной массы.

Растворители могут влиять на размеры цепи совершенно различным образом. В хорошем растворителе преобладают вытянутые и более открытые конформации, поскольку молекулы при этом могут быть сильнее сольватированы. Поэтому *эффективный взаимный* исключенный объем пар сегментов цепи оказывается больше, чем фактический исключенный объем самих сегментов. В этих случаях α может быть значительно больше единицы. В нейтральном растворителе взаимодействия сегментов между собой энергетически эквивалентны взаимодействиям сегмент — растворитель. В этой ситуации эффективный взаимный исключенный объем сегментов не изменяется под влиянием растворителя и эффекты исключенного объема оказываются не столь значительными, как для хорошего растворителя. С другой стороны, в плохом растворителе преобладает притяжение между сегментами и компактные конфигурации оказываются более выгодными, чем более открытые рыхлые состояния. В результате влияние исключенного объема компенсируется возрастанием относительной роли более компактных структур (в которых, конечно, не происходит пересечений сегментов) по сравнению с более открытыми конформациями. Когда эти противоположные влияния в точности уравниваются, $\langle r^2 \rangle$ становится равным $\langle r^2 \rangle_0$ и $\alpha = 1$.

ТЕТА-РАСТВОРИТЕЛИ И ТЕТА-ТЕМПЕРАТУРА

Растворители, для которых $\alpha = 1$, называются тета-растворителями. В общем случае α зависит от температуры, так что «тета-точка» определяется как температура, при которой $\alpha = 1$. При этой температуре второй вириальный коэффициент осмотического давления (который зависит от межмолекулярных взаимодействий) обращается в нуль, поскольку эффекты, обусловленные межмолекулярным исключенным объемом, исчезают при тех же условиях, при которых становятся равными нулю эффекты внутримолекулярного исключенного объема. В этих условиях осмотическое давление в широком диапазоне концентраций полимера в растворе подчиняется уравнению Вант-Гоффа (см. гл. 25). Таким образом, тета-точка для полимеров аналогична точке Бойля для реальных газов. В точке Бойля силы притяжения между молекулами газа в точности уравнивают влияние взаимной непроницаемости частиц и газ ведет себя как идеальный в широком диапазоне давлений.

На практике не всегда удается найти растворитель и температуру, при которых $\alpha = 1$, поэтому параметр α приходится оценивать. Он может быть вычислен на основании теории полимерных растворов, в которой устанавливается связь между α и молекулярной массой, характеристической вязкостью и вторым осмотическим вириальным коэффициентом (см. Flory, 1953).

В экспериментальные значения $\langle r^2 \rangle_0$ для высокомолекулярных образцов, приведенные в табл. 18.1 и 18.2, внесены поправки, связанные с эффектом исключенного объема. Для коротких цепей, перечисленных в табл. 18.2, этот эффект оказывается незначительным.

Краткие выводы

Для количественного рассмотрения конформаций полимерных цепей разработаны методы расчетов конформационных параметров, таких, как средний квадрат расстояний

между концами невозмущенной цепи $\langle r^2 \rangle_0$. Анализ идеализированных модельных цепей — свободно-сочлененной цепи и цепи со свободным вращением — служит основой для анализа свойств реальных цепей.

Трудности, связанные с рассмотрением реальных цепей, в значительной мере снимаются при использовании поворотно-изомерного приближения. В этом приближении для расчетов внутрицепочечных параметров оказывается весьма эффективным использование матричных методов. В случае гомополипептидов рассчитанные размеры цепей зависят от природы аминокислотных остатков. Аналогично этому рассчитанные размеры сополимеров оказываются чувствительны к аминокислотному составу.

Экспериментальное определение $\langle r^2 \rangle_0$ было выполнено для нескольких различных полипептидов; измеренные значения хорошо согласуются с расчетными данными.

Можно вычислить и другие параметры цепей, зависящие от их конформаций. Для этой цели оказываются весьма полезными понятия статистического сегмента и персистентной длины, позволяющие глубже понять конформационные особенности различных гомополипептидов. Например, сравнительно большой размер статистического сегмента или персистентной длины указывает на жесткость цепи.

Эффекты исключенного объема приводят к изменению размеров цепи по сравнению с рассчитанными невозмущенными размерами. Однако эффективный взаимный исключенный объем пар сегментов цепи зависит от характеристик растворителя. Иногда оказывается возможным найти такой растворитель (тета-растворитель, который, как правило, является плохим растворителем для полимера), что при некоторой температуре (в тета-точке) эффекты исключенного объема в точности компенсируются увеличением статистического веса более компактных конформаций цепи, вызванным влиянием этого растворителя. В этом случае эффекты исключенного объема сводятся к нулю и цепь принимает невозмущенные размеры. В тех случаях, когда «тета»-условия найти нельзя, для коррекции размеров цепей применяется теория полимерных растворов. Все это обычно позволяет сравнить экспериментально определенные размеры цепи с рассчитанными.

Задачи

18.1. Выведите формулу (18.24), проинтегрировав (18.23) с функцией распределения (18.22).

18.2. Предположим, что у нас имеется набор цепей различной молекулярной массы. Конфигурации цепей могут быть описаны с помощью модели свободно-сочлененной цепи, содержащей N_s эквивалентных статистических сегментов длины l_s , которая не зависит от размеров цепей; величина N_s прямо пропорциональна молекулярной массе M (т.е. $M = \text{const } N_s$). Во всех случаях $N_s > 30$. Нас интересует вероятность $p(N_s)$ того, что два конца цепи из N_s сегментов окажутся на расстоянии одного статистического сегмента l_s (или ближе) друг от друга, т.е. что расстояние между концами окажется в пределах $0 \leq r \leq l_s$. Покажите, что

$$p(N_s) = \text{const } M^{-3/2}$$

т.е. что эта вероятность обратно пропорциональна молекулярной массе в степени 3/2.

18.3. Полипептид состоит из $(n + 1)$ -го аминокислотного остатка, пронумерованного от 0 до n . Нам нужно вычислить средний квадрат расстояния между остатками k и p , $\langle r_{kp}^2 \rangle$, где k и p могут быть любыми остатками в последовательности, но $p > k$. Преподаватель утверждает, что для решения задачи нужно формально вычислить значение выражения

$$\langle r_{kp}^2 \rangle = (p - k)l^2 + 2 \left\langle \sum_{j=i+1}^p \sum_{i=k}^p (\hat{\mathbf{l}}_i \cdot \hat{\mathbf{l}}_j) \right\rangle$$

где через l обозначена длина виртуальной связи, а $\hat{\mathbf{l}}_i$ и $\hat{\mathbf{l}}_j$ соответствуют i -му и j -му векторам виртуальных связей. Прав ли преподаватель? Почему? Если он не прав, дайте правильное выражение.

18.4. Может ли клубкообразный полимер с ограниченным вращением вокруг составляющих его связей иметь среднеквадратичное расстояние между концами меньше, чем соответствующее расстояние для такой же цепи со свободным вращением вокруг каждой связи? (Предполагается, что цепь содержит большое число связей.) Почему?

18.5. Короткие полипептидные цепи, находящиеся в цвиттерионной форме, были исследованы в водных растворах; были определены расстояния между концами для этих цепей и сопоставлены с вычисленными величинами. Расчеты выполнялись обычным способом, но при этом полностью пренебрегалось возможным электростатическим притяжением между заряженными концами цепей. Оказалось, что для коротких олигомеров, когда $n = 2$ или 3, вычисленные и наблюдаемые значения $\langle r^2 \rangle$ находятся в хорошем согласии, но при больших n согласие значительно ухудшается. Попытайтесь объяснить это наблюдение. (Замечание: n = числу остатков.)

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Бирштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформация макромолекул. — М.: Наука, 1964.
- Flory P. J., 1953. Principles of Polymer Chemistry, Ithaca, N. Y., Cornell Univ. Press. [Классическая работа, в которой рассмотрены разные вопросы и дана историческая перспектива.]
- Flory P. J., 1969. Statistical Mechanics of Chain Molecules, New York, Wiley. [Имеется перевод: Флори П. Статистическая механика цепных молекул. — М.: Мир, 1971. Монография для специалистов, в которой всесторонне рассмотрены методы анализа свойств, зависящих от конформации, в особенности те из них, которые используют матричную алгебру.]
- Tanford C., 1961. Physical Chemistry of Macromolecules, New York, Wiley. [Имеется перевод: Танфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1965. В гл. 3 освещены методы расчета размеров модельных цепей и близкие вопросы.]
- Волькенштейн М. В. Конформационная статистика полимерных цепей — Л.: Изд-во АН СССР, 1959.
- Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика. — М.: Наука, 1975. [В гл. 3 рассмотрены некоторые вопросы статистики полимерных цепей.]
- Yamakawa H., 1971. Modern Theory of Polymer Solutions, New York, Harper and Row. [В гл. 2 и 3 рассмотрены некоторые вопросы статистики полимерных цепей.]

Специальная

- Brant D. A.*, 1976. Conformational theory applied to polysaccharide structure, *Quart. Rev. Biophys.*, **9**, 527.
- Brant D. A., Flory P. J.*, 1965. The configuration of random polypeptide chains, II: Theory, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2791.
- Miller W. G., Brant D. A., Flory P. J.*, 1967. Random coil configurations of polypeptide copolymers, *J. Mol. Biol.*, **23**, 67.
- Miller W. G., Goebel C. V.*, 1968. Dimensions of protein random coils, *Biochemistry*, **7**, 3925.
- Ullman R.*, 1978. An unsophisticated calculation of the excluded volume effect, *Macromolecules*, **11**, 1292.
[Небольшая заметка, в которой рассмотрены приближенные методы вычисления исключенного объема и приведены ссылки на более ранние работы, посвященные этому вопросу.]
- Yevich R., Olson W. K.*, 1979. The spatial distributions of randomly coiling polynucleotides, *Biopolymers*, **18**, 113.

Глава 19 Основы гидродинамики полимерной цепи и размеры молекулы полимера

19.1. Гидродинамика полимерной цепи

Конформация полимерной цепи тесно связана с ее гидродинамическими параметрами, такими, как характеристическая вязкость и коэффициент трения, и обычно измерения именно этих характеристик являются той основой, на которой строится наше представление о конформации полимеров в растворе. В гл. 18, например, мы сравнивали размеры цепей высокомолекулярных полипептидов, предсказываемые теорией, с теми значениями, которые были рассчитаны на основе измерений характеристической вязкости (см. табл. 18.2). Как будет показано в этой главе, с помощью гидродинамических измерений можно также получить сведения о размерах цепей нуклеиновых кислот в растворе, как одно-, так и двухцепочечных. В частности, анализ гидродинамических свойств высокомолекулярной двухцепочечной ДНК убедительно свидетельствует в пользу того, что такая ДНК представляет собой жесткую нить с плавно изменяющейся кривизной (модель так называемой червеобразной цепи) и имеет конформацию клубка.

Гидродинамическое поведение полимерной цепи — это сложная тема, затрагивающая широкий круг вопросов. В этой главе мы рассмотрим лишь некоторые основные аспекты этого поведения, с тем чтобы связать размеры цепи с ее гидродинамическими характеристиками. При этом мы будем исходить из элементарных гидродинамических представлений, развитых в гл. 10 — 12. Тот, кто хочет более основательно ознакомиться с гидродинамикой полимерных цепей, найдет соответствующие ссылки в конце этой главы.

19.2. Свободно-протекаемый клубок

Чтобы понять, чем обусловлена характеристическая вязкость статистических клубков, рассмотрим модель «свободно-протекаемого» клубка. Полимер при этом представляют в виде цепочки из бусин, которые обтекаются растворителем при ламинарном течении последнего. В предельном случае свободного протекания возмущение потока растворителя, вызываемое какой-либо бусиной, никак не сказывается на течении растворителя в области любой другой бусины. Другими словами, поток растворителя в области бусины j такой, как если бы вокруг нее никаких других бусин не было. Хотя, как мы увидим далее, для реальных цепей такое приближение и не выполняется, однако рассмотрение модели свободно-протекаемого клубка в значительной мере проясняет механику тех процессов, которые обуславливают вязкость растворов полимеров.

ВРАЩАТЕЛЬНОЕ ДВИЖЕНИЕ КЛУБКОВ В ЛАМИНАРНОМ ПОТОКЕ

Рассмотрим статистический клубок, представленный моделью бус (или четок), который движется в ламинарном потоке. Пусть градиент скорости в растворителе создается за счет движения некоторой плоскости в направлении x с постоянной скоростью относительно другой, неподвижной плоскости, расположенной параллельно первой. Градиент скорости, $\gamma = dv_x/dz$, будет направлен по оси z (рис. 19.1). При этом оказывается, что

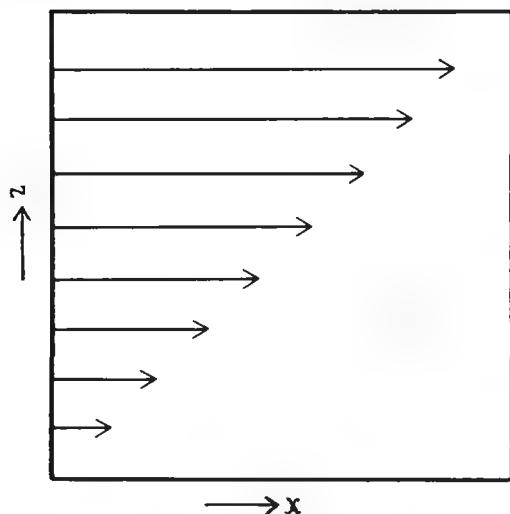


РИС. 19.1. Градиент скорости, создаваемый движением одной пластины параллельно другой, неподвижной.

область, занимаемая статистическим клубком, пересекает линии тока с различными значениями v_x . Очевидно, что движение клубка как целого в растворителе нельзя согласовать одновременно со скоростями всех этих линий тока, если клубок при этом не вращается. Будем считать поэтому, что центр инерции полимерной молекулы перемещается со скоростью, которую имеет линия тока растворителя, проходящая через эту точку, а сама молекула вращается вокруг оси, проходящей через центр инерции. Совместим далее начало

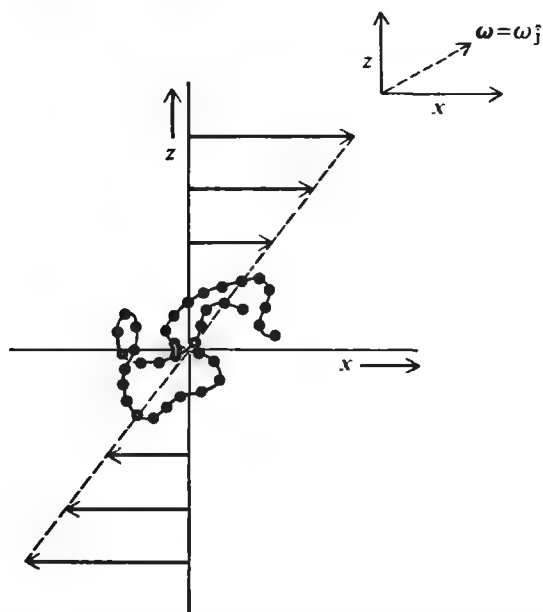


РИС. 19.2. Вращение полимерной молекулы. Перемещение растворителя относительно центра инерции полимера создает вращающий момент, вызывающий вращение молекулы. В верхней части рисунка показано, как ориентирован вектор угловой скорости ω .

нашей системы координат с центром инерции полимерной молекулы (рис. 19.2). Саму полимерную молекулу будем представлять себе как цепочку из n бусин, гидродинамически связанных друг с другом. Каждая бусина имеет один и тот же коэффициент трения ζ . При наличии градиента в результате действия сил трения между бусинами и растворителем возникает приложенный к молекуле вращающий момент, приводящий ее во вращательное движение вокруг оси y . Однако при вращении создается и тормозящий момент за счет движения элементов молекулы *перпендикулярно* линиям тока. В конечном счете устанавливается динамическое равновесие, так что действующий на молекулу результирующий момент равен нулю, а сама молекула вращается с постоянной угловой скоростью ω . Зная эту постоянную угловую скорость вращения и коэффициент трения бусины, мы можем рассчитать вклад в вязкость раствора, который обусловлен присутствием молекул полимера.

УГЛОВАЯ СКОРОСТЬ ВРАЩЕНИЯ ПОЛИМЕРНОЙ МОЛЕКУЛЫ В ГРАДИЕНТЕ СКОРОСТИ

Скорость $\mathbf{v}_j$ растворителя в месте нахождения бусины j определяется равенством

$$\mathbf{v}_j = \hat{\mathbf{i}}\gamma z_j \quad (19.1)$$

где $\hat{\mathbf{i}}$ — единичный вектор, направленный по оси x , а z_j — проекция на ось z вектора, соединяющего бусину j с центром инерции молекулы (см. рис. 19.2). Угловая скорость ω может быть задана в векторном представлении: $\omega = \omega \hat{\mathbf{i}}$, где $\hat{\mathbf{i}}$ — единичный вектор вдоль оси y (в случае, изображенном на рис. 19.2, этот вектор перпендикулярен плоскости $x - z$, совпадающей с плоскостью страницы, и направлен от читателя). Пусть $\mathbf{s}_j(x_j, y_j, z_j) = \hat{\mathbf{i}}x_j + \hat{\mathbf{j}}y_j + \hat{\mathbf{k}}z_j$ — вектор, соединяющий центр инерции молекулы с бусиной j ; тогда, учитывая то, что скорость $\mathbf{u}_j$ бусины j и вектор $\mathbf{s}_j$ взаимно перпендикулярны, получим

$$\mathbf{u}_j = \omega \times \mathbf{s}_j = \hat{\mathbf{i}}\omega z_j - \hat{\mathbf{k}}\omega x_j \quad (19.2)$$

Скорость $\mathbf{u}_{\text{отн}}$ движения растворителя относительно бусины j определяется равенством

$$\mathbf{u}_{\text{отн}} = \mathbf{v}_j - \mathbf{u}_j \quad (19.3)$$

а силу трения $\mathbf{F}_j$, действующую на бусину j , можно найти по формуле

$$\mathbf{F}_j = \zeta(\mathbf{v}_j - \mathbf{u}_j) = \zeta[\hat{\mathbf{i}}(\gamma - \omega)z_j + \hat{\mathbf{k}}\omega x_j] \quad (19.4)$$

где ζ — коэффициент трения отдельной бусины¹. Вращающий момент τ_j , приложенный к бусине j , определяется равенством

$$\tau_j = \mathbf{s}_j \times \mathbf{F}_j \quad (19.5)$$

$$= \hat{\mathbf{i}}\zeta\omega x_j y_j + \hat{\mathbf{j}}\zeta[(\gamma - \omega)z_j^2 - \omega x_j^2] - \hat{\mathbf{k}}\zeta(\gamma - \omega)y_j z_j \quad (19.6)$$

где векторное произведение уравнения (19.5) дано в развернутом виде в уравнении (19.6).

¹ Правые части уравнений (10.29) и (19.4) совпадают во всем, за исключением того, что они имеют разные знаки. В формуле (10.29) $\mathbf{F}_j$ представляет собой силу, с которой бусина (или сегмент) действует на жидкость, в то время как $\mathbf{F}_j$ в формуле (19.4) — это сила, действующая на бусину j (со стороны жидкости).

Условие динамического равновесия означает, что $\langle \sum_j \tau_j \rangle = 0$; здесь сумма берется по всем бусинам в цепочке, а угловые скобки означают, что это среднестатистическая величина. Поскольку проекции моментов на оси x и z должны быть равны нулю (так как молекула вращается только вокруг оси y), мы заключаем, что $\sum_j x_j y_j = 0$ и $\sum_j y_j z_j = 0$. Таким образом,

$$\left\langle \sum_j \tau_j \right\rangle = \hat{\mathbf{j}} \zeta \left[(\gamma - \omega) \left\langle \sum_j z_j^2 \right\rangle - \omega \left\langle \sum_j x_j^2 \right\rangle \right] = 0 \quad (19.7)$$

Если предположить, что сдвиговые усилия не настолько велики, чтобы это могло привести к изменению среднего распределения сегментов цепи, то клубок должен обладать сферической симметрией относительно своего центра инерции, т.е. $\langle \sum_j z_j^2 \rangle = \langle \sum_j x_j^2 \rangle = \langle \sum_j y_j^2 \rangle = (1/3) \langle \sum_j s_j^2 \rangle$. С учетом этого получаем

$$\left\langle \sum_j \tau_j \right\rangle = \hat{\mathbf{j}} \zeta (\gamma - 2\omega) (1/3) \left\langle \sum_j s_j^2 \right\rangle = 0 \quad (19.8)$$

Нетрудно видеть, что решение уравнения (19.8) имеет вид

$$\omega = \gamma/2 \quad (19.9)$$

Таким образом, полимерная молекула вращается с угловой скоростью, величина которой составляет половину величины градиента скорости.

Средняя величина рассеиваемой в единицу времени энергии при движении бусины j — это просто произведение силы трения на относительную скорость растворителя в окрестности бусины j . С помощью уравнений (19.1) — (19.4) и (19.8) находим

$$\mathbf{F}_j \cdot \mathbf{u}_{\text{отн}} = \zeta (\gamma^2/4) (x_j^2 + z_j^2) = \zeta (\gamma^2/4) (2/3) \langle s_j^2 \rangle = \zeta (\gamma^2/6) \langle s_j^2 \rangle \quad (19.10)$$

ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКАЯ ВЯЗКОСТЬ СВОБОДНО-ПРОТЕКАЕМОГО КЛУБКА

Пользуясь уравнением (19.10), нетрудно вычислить характеристическую вязкость полимерной молекулы, но для этого вспомним сначала, как определяется коэффициент вязкости η . Если к верхней пластине вискозиметра, изображенного на рис. 19.1, приложена сила F , то коэффициент вязкости (или просто вязкость) η определяется равенством

$$F = \eta \gamma A \quad (19.11)$$

где A — площадь пластины. Полная энергия, рассеиваемая в единицу времени, равна

$$Fu = \eta \gamma^2 A h \quad (19.12)$$

где h — расстояние между пластинами, а $u = \gamma h$ — скорость движущейся пластины. Из уравнения (19.12) следует, что η — это энергия, рассеиваемая в единице объема в единицу времени, деленная на квадрат градиента скорости:

$$\eta = Fu/\gamma^2 Ah \quad (19.13)$$

Возвращаясь к уравнению (19.10), мы видим, что полный вклад в величину рассеиваемой энергии от одной полимерной молекулы составляет $(\zeta/6)\gamma^2 \sum_j \langle s_j^2 \rangle$; здесь суммирование ведется по всем бусинам в цепочке. Обозначая через η_0 вязкость растворителя, получим следующее выражение, описывающее суммарный вклад в вязкость от всех полимерных молекул, присутствующих в 1 см³ раствора:

$$\eta - \eta_0 = (\zeta/6) \left(\sum_j \langle s_j^2 \rangle \right) c N_0 / M \quad (19.14)$$

где c — концентрация полимера в г · см⁻³, так что cN_0/M представляет собой число молекул полимера в 1 см³ (N_0 — число Авогадро, а M — молекулярная масса полимера). Из уравнения (19.14) легко получить простое выражение для характеристической вязкости $[\eta]$, заметив предварительно, что $\sum_j \langle s_j^2 \rangle = n \langle R_G^2 \rangle$, где $\langle R_G^2 \rangle$ — средний квадрат радиуса инерции (см. гл. 18), а $M/n = M_0$, где M_0 — молекулярная масса мономера (бусины). Таким образом¹,

$$\lim_{c \rightarrow 0} [(\eta - \eta_0)/\eta_0 c] = [\eta] = (\zeta/6\eta_0)(N_0/M_0) \langle R_G^2 \rangle \quad (19.15)$$

Поскольку для полимеров с большим n имеем $\langle R_G^2 \rangle_0 \propto \langle r^2 \rangle_0$ [уравнение (18.9)], а $\langle r^2 \rangle_0 \propto M$ (гл. 18), мы приходим к выводу, что в случае невозмущенного свободно-протекаемого полимерного клубка $[\eta] \propto M$.

Чтобы понять физический смысл этих результатов, потребуются некоторые пояснения. Заметим, что вклад в вязкость, вносимый одной полимерной молекулой, составляет $(\zeta/6) \times \sum_j \langle s_j^2 \rangle = (\zeta/6)n \langle R_G^2 \rangle$. Линейную зависимость только от $n\zeta$ было бы нетрудно объяснить:

такая зависимость явилась бы простым отражением того факта, что, чем длиннее полимер, тем больше бусин взаимодействует с растворителем и рассеивает энергию. Однако $\langle R_G^2 \rangle$ в свою очередь зависит от n , и этот зависимый от n вклад в рассеяние энергии объясняется тем, что по мере увеличения n большая часть бусин оказывается все дальше и дальше от центра инерции. Эти наружные бусины рассеивают больше энергии по сравнению с бусинами, находящимися ближе к центру инерции, поскольку их скорость (u_j) больше. Поэтому по мере возрастания n средняя величина рассеиваемой энергии в пересчете на одну бусину также возрастает.

НЕДОСТАТКИ СВОБОДНО-ПРОТЕКАЕМОЙ МОДЕЛИ

Приведенные выше результаты получены для случая так называемого свободно-протекаемого полимерного клубка, в котором гидродинамическое взаимодействие между бусинами отсутствует, т.е. на потоке в области бусины j никак не сказывается присутствие других бусин. Ясно, что такое допущение является искусственным, поскольку внутри полимерного клубка скорость течения растворителя должна в значительной степени зависеть от того, как расположены бусины; при этом потоки, обтекающие разные бусины, должны взаимодействовать и возмущать друг друга (см. гл. 10). И действительно, непри-

¹ При проведении измерений экстраполяция выражения, стоящего в левой части уравнения (19.15), к $c = 0$ необходима для того, чтобы исключить влияние взаимодействий между молекулами полимера. В приводимом здесь анализе модели свободно-протекаемого клубка мы никак не учитывали эти взаимодействия.

годность свободно-протекаемой модели в случае статистических клубков подтверждается экспериментальными данными, согласно которым $[\eta]$ таких клубков пропорциональна M^x , где x обычно значительно меньше единицы; в большинстве случаев x лежит в диапозоне от 0,5 до 0,7.

19.3. Характеристическая вязкость клубков, для которых условие свободного протекания не выполняется

В случае неполной гидродинамической проницаемости клубка растворитель в центральных областях макромолекулы движется почти как одно целое с полимером. Таким образом, молекулы растворителя внутри клубка ведут себя так, как если бы они были захвачены областями с высокой плотностью полимерных сегментов. В результате энергетические потери на трение в этих центральных областях оказываются в этом случае меньше, чем для полностью проницаемых клубков. Строгий вывод соответствующего соотношения, связывающего $[\eta]$ и M , для случая неполной проницаемости клубка гораздо сложнее, чем для свободно-протекаемого клубка; мы ограничимся здесь упрощенным его рассмотрением.

Для сплошных частиц характеристическая вязкость $[\eta]$ описывается соотношением

$$[\eta] = \nu V_{уд} \quad (19.16)$$

где ν — фактор формы (коэффициент Симхи), а $V_{уд}$ — удельный объем (см. гл. 12). В случае недеформируемой (жесткой) сферы $\nu = 2,5$, а $V_{уд}$ — постоянная, не зависящая от молекулярной массы¹. Поэтому для сферических частиц $[\eta]$ не зависит от их размеров (или массы). В случае статистического клубка мы можем рассматривать полимерную молекулу как облако сегментов, имеющее сферическую форму. Это облако, конечно, неоднородно, что с очевидностью следует из вида радиальной функции распределения для статистически свернутой цепи (см. рис. 18.6, Б). Положим далее, что это облако сегментов можно заменить непроницаемой (для растворителя) гидродинамически эквивалентной сферой, характеристическая вязкость которой равна характеристической вязкости статистического клубка. Естественно предположить, что объем этой сферы пропорционален $\langle r^2 \rangle^{3/2}$, тогда удельный объем будет пропорционален $\langle r^2 \rangle^{3/2}/M$, где M — молекулярная масса полимера. Отсюда мы можем заключить, что

$$[\eta] \propto \langle r^2 \rangle^{3/2}/M \quad (19.17)$$

Более строгий вывод (см. Flory, 1953) приводит к соотношению

$$[\eta] = \Phi_{кл} \langle r^2 \rangle^{3/2}/M \quad (19.18)$$

где $\Phi_{кл} \cong 2,1 \cdot 10^{23}$, если $[\eta]$ измеряется в $\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, а $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ — в см. Параметр $\Phi_{кл}$ имеет смысл универсальной постоянной: ему приписывается одно и то же значение для всех статистических клубков. Поэтому, зная M и определив $[\eta]$, можно сразу же вычислить размеры клубка. Этот способ определения размеров полимерных молекул с помощью уравнения (19.18) на основе вискозиметрических измерений очень распространен.

В отличие от случая сплошной сферы характеристическая вязкость статистического клубка зависит от его размеров (а значит, и от его молекулярной массы). Для невозму-

¹ Уравнение (19.16) тождественно уравнению (12.21), если положить $V_{уд} = \bar{V}_2 + \delta_1 V_1$.

Таблица 19.1

ЗАВИСИМОСТЬ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ДЛЯ МАКРОМОЛЕКУЛ РАЗНОЙ ФОРМЫ

Модель макромолекулы	Связь между $[\eta]$ и M
Сплошная сфера	$[\eta]$ не зависит от M
Очень длинный стержень (отношение длины к диаметру ≥ 100)	$[\eta] \propto M^{1,8}$
Тонкий диск (отношение ширины к толщине ≥ 100)	$[\eta] \propto M^{1,0}$
Длинная цепь, свернутая в статистический клубок	$[\eta] \propto M^x$, где $0,5 \leq x \leq 0,8$
Длинная цепь, свернутая в статистический клубок (случай невозмущенной цепи)	$[\eta] \propto M^{0,5}$
Гипотетический свободно-протекаемый полимерный клубок (невозмущенная цепь)	$[\eta] \propto M$

шенных цепей, например, при достаточно большой молекулярной массе $\langle r^2 \rangle_0^{1/2} = (C_\infty nl^2)^{1/2} \propto M^{1/2}$ (см. гл. 18). Отсюда для невозмущенных цепей, молекулярные массы которых достаточно велики, получаем, согласно формуле (19.18), $[\eta] \propto M^{1/2}$. То, что $[\eta]$ пропорциональна $M^{1/2}$, является отличительной особенностью вискозиметрического поведения невозмущенных цепей.

Для случая, когда нельзя пренебречь влиянием объемных эффектов, $\langle r^2 \rangle^{1/2} = \alpha^3 \langle r^2 \rangle_0^{1/2}$, где коэффициент объемного расширения (набухания) клубка α^3 (гл. 18) пропорционален M в степени, величина которой лежит в диапазоне от 0,0 до 0,3. Отсюда следует, что для достаточно длинных цепей $\langle r^2 \rangle^{1/2} \propto M^a$, где $0,5 \leq a \leq 0,6$. Для характеристической вязкости в соответствии с формулой (19.18) имеем

$$[\eta] = \Phi_{\text{кл}} \langle r^2 \rangle^{3/2} / M = \Phi_{\text{кл}} \alpha^3 \langle r^2 \rangle_0^{3/2} / M \propto M^x \quad \text{где } x = 3a - 1 \quad (19.19)$$

Таким образом, в общем случае для статистических клубков $[\eta] \propto M^x$, где x — величина постоянная для данных условий; обычно $0,5 \leq x \leq 0,7$, но встречаются и большие значения x , вплоть до 0,8.

Из табл. 19.1 видно, что зависимость $[\eta]$ от M для статистических клубков имеет весьма характерный вид. В таблице представлен характер зависимости $[\eta]$ от M для случаев сплошной сферы, длинного стержня, тонкого диска, статистического клубка и гипотетического свободно-протекаемого полимерного клубка. Соотношение, связывающее $[\eta]$ и M , для длинного стержня и тонкого диска можно найти с помощью формул для коэффициента Симхи, приведенных в гл. 12. Можно видеть, что характер зависимости $[\eta]$ от M в большинстве рассматриваемых случаев сугубо индивидуален. Зависимость вида $[\eta] \propto M^x$, где $0,5 \leq x \leq 0,7$, наблюдаемая в широком диапазоне молекулярных масс, является признаком того, что молекулы имеют конформацию статистического клубка.

19.4. Коэффициент трения и коэффициент седиментации

Коэффициент трения — это еще один очень полезный гидродинамический параметр. Обычно его находят путем диффузионных измерений или измерений коэффициента седиментации. Для коэффициента трения f сплошной жесткой сферы радиуса r выполняется

ВЕНСТВО

$$f = 6\pi\eta_0 r \quad (19.20)$$

(см. гл. 10). Так как $r \propto (\text{объем})^{1/3}$, то коэффициент трения сплошной сферы пропорционален $M^{1/3}$. Если полимер имеет конформацию статистического клубка, мы вновь имеем дело со сферическим облаком сегментов, которое можно заменить гидродинамически эквивалентной сплошной сферой радиуса r_s . Коэффициент трения тогда равен $6\pi\eta_0 r_s$. Мы нашли, что радиус такой эквивалентной сферы должен быть пропорционален $\langle r^2 \rangle^{1/2}$; коэффициент пропорциональности, однако, невозможно вычислить без детального рассмотрения гидродинамики данной системы. Строгое рассмотрение приводит к формуле

$$f = P_{\text{кл}} \eta_0 \langle r^2 \rangle^{1/2} \quad (19.21)$$

где $P_{\text{кл}} = 5,1$ (см. Flory, 1953; Kirkwood, Riseman, 1948). Так как $\langle r^2 \rangle^{1/2} \propto M^a$, то мы заключаем, что $f \propto M^a$, где $0,5 \leq a \leq 0,6$.

Зависимость коэффициента седиментации от размеров молекулы и молекулярной массы получим, подставив выражение для f из уравнения (19.21) в формулу для коэффициента седиментации при бесконечном разбавлении (см. гл. 11):

$$s^0 = M(1 - \bar{V}_2 \rho) / N_0 f \propto M^{1-a} \quad (19.22)$$

где $\bar{V}_2$ — парциальный удельный объем, ρ — плотность растворителя. В табл. 19.2 приведены зависимости f и s^0 от M для нескольких структур, в том числе для статистически свернутой цепи. Зависимости для стержня и диска следуют из формул для коэффициента Перрена, приведенных в гл. 10. Можно видеть, что, как и в случае $[\eta]$, зависимость f и s^0 от M для статистических клубков отличается от аналогичных зависимостей для частиц других типов.

КОЭФФИЦИЕНТ ТРЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКАЯ ВЯЗКОСТЬ

Небезынтересно проанализировать связь между коэффициентом трения и характери-

Таблица 19.2

ЗАВИСИМОСТЬ КОЭФФИЦИЕНТА ТРЕНИЯ И КОЭФФИЦИЕНТА СЕДИМЕНТАЦИИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ДЛЯ МАКРОМОЛЕКУЛ РАЗНОЙ ФОРМЫ

Модель макромолекулы	Связь между f и M	Связь между s^0 и M
Сплошная сфера	$f \propto M^{1/3}$	$s^0 \propto M^{2/3}$
Очень длинный стержень (отношение длины к диаметру ≥ 100)	$f \propto M^{0,8}$	$s^0 \propto M^{0,2}$
Тонкий диск (отношение ширины к толщине ≥ 100)	$f \propto M^{2/3}$	$s^0 \propto M^{1/3}$
Длинная цепь, свернутая в статистический клубок	$f \propto M^a$	$s^0 \propto M^{1-a}$
Длинная цепь, свернутая в статистический клубок (случай невозмущенной цепи)	$f \propto M^{0,5}$	$s^0 \propto M^{0,5}$
Гипотетический свободно-протекаемый полимерный клубок (невозмущенная цепь)	$f \propto M$	s^0 не зависит от M

стической вязкостью. Из уравнений (19.18) и (19.21) получаем

$$f = \eta_0 P_{\text{кл}} \Phi_{\text{кл}}^{-1/3} (M[\eta])^{1/3} \quad (19.23)$$

Напомним, что $[\eta]$ можно рассматривать как величину, которая пропорциональна объему единицы массы [уравнение (19.16)]; поэтому произведение $M[\eta]$ пропорционально эффективному гидродинамическому объему клубка. С другой стороны, коэффициент трения клубка пропорционален эффективному гидродинамическому радиусу полимерной молекулы [см. уравнение (19.20) и последующие замечания]. Учитывая сказанное выше, мы видим, что уравнение (19.23) является простой констатацией того, что эффективный гидродинамический радиус при поступательном движении (выражаемый через коэффициент трения) пропорционален кубическому корню из эффективного объема при сдвиге (определяемого характеристической вязкостью). Возникает следующий вопрос: насколько различаются численные значения коэффициента пропорциональности ($P_{\text{кл}} \Phi_{\text{кл}}^{-1/3}$), связывающего f и $(M[\eta])^{1/3}$ η_0 в уравнении (19.23), и аналогичного коэффициента, который получился бы в *предположении* о равенстве радиусов эквивалентных гидродинамических сфер соответственно при поступательном движении и при сдвиге? Чтобы ответить на него, обратимся к уравнению (19.16), из которого следует, что

$$[\eta] = v V_3 N_0 / M \quad (19.24)$$

$$= 2,5 N_0 (4/3) \pi r_3^3 / M \quad (19.25)$$

Здесь характеристическая вязкость $[\eta]$ измеряется в $\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, а V_3 и r_3 — это соответственно объем и радиус эквивалентной сферы (*при сдвиге*). Коэффициент трения эквивалентной сферы можно представить как $f = 6\pi\eta_0 r_3$, где r_3 — радиус эквивалентной сферы *при поступательном движении*. Выразив r_3 (при сдвиге) из уравнения (19.25) и подставив это выражение в формулу $f = 6\pi\eta_0 r_3$, получаем

$$f = 6\pi(2,5 N_0 4\pi/3)^{-1/3} \eta_0 ([\eta] M)^{1/3} \quad (19.26)$$

$$= (1,02 \times 10^{-7}) \eta_0 ([\eta] M)^{1/3} \quad (19.27)$$

Для $P_{\text{кл}} = 5,1$ и $\Phi_{\text{кл}} = 2,1 \cdot 10^{23}$ значение коэффициента $P_{\text{кл}} \Phi_{\text{кл}}^{-1/3}$ [из уравнения (19.23)] составляет приблизительно $0,86 \cdot 10^{-7}$. Тот факт, что коэффициент пропорциональности из уравнения (19.27) и коэффициент $P_{\text{кл}} \Phi_{\text{кл}}^{-1/3}$ настолько близки, весьма интересен, поскольку из того, что было изложено ранее, вовсе не следует, что эквивалентные сферы соответственно при поступательном движении и при сдвиге должны иметь близкие радиусы.

КОЭФФИЦИЕНТ МАНДЕЛЬКЕРНА—ФЛОРИ—ШЕРАГИ

С уравнением (19.23) связан еще один важный вывод. С учетом соотношения (19.22) это уравнение можно переписать в виде

$$\Phi_{\text{кл}}^{1/3} P_{\text{кл}}^{-1} = \beta_s = \eta_0 (M[\eta])^{1/3} / f \quad (19.28)$$

$$= \eta_0 N_0 s^0 M^{-2/3} [\eta]^{1/3} / (1 - \bar{V}_2 \rho) \quad (19.29)$$

(см. Mandelkern, Flory, 1952; Scheraga, Mandelkern, 1953). Уравнение (19.29) важно вот почему: из него следует, что некая комбинация величин η_0 , s^0 , M , $[\eta]$, $\bar{V}_2$ и ρ равна постоянной

Таблица 19.3

ЗНАЧЕНИЯ β_s ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМ ПОЛИМЕР — РАСТВОРИТЕЛЬ ¹⁾

Полимер	Растворитель	$\beta_s \cdot 10^{-7}$
Полистирол	Метилэтилкетон	1,2
Полистирол	Толуол	1,1
Ацетилцеллюлоза	Ацетон	1,3
Полисаркозин	Вода	1,1
Полиизобутилен	Циклогексан	1,2
Полиметилметакрилат	Ацетон	1,2
Среднее значение:		1,2

¹⁾ Flory P.J. Principles of Polymers Chemistry, Ithaca, N.Y., Cornell Univ. Press, 1953, p. 628.

(β_s) для всех полимеров, имеющих конформацию статистического клубка вне зависимости от их химического состава. Постоянную β_s иногда называют коэффициентом Манделькерн—Флори—Шераги ¹. В табл. 19.3 приведено несколько найденных опытным путем значений β_s для ряда полимеров в разных растворителях, в том числе для полисаркозина (полипептид; саркозин = N-метилглицин). Здесь представлены самые разные системы полимер — растворитель, и тем не менее с точностью до ошибки эксперимента β_s действительно оказывается постоянной величиной. Среднее значение β_s составляет $1,2 \cdot 10^7$, что согласуется со значениями $P_{\text{кл}} = 5,1$ и $\Phi_{\text{кл}} = 2,1 \cdot 10^{23}$. Поскольку β_s является постоянной величиной, ясно, что уравнение (19.29) можно с успехом использовать для вычисления молекулярной массы по результатам измерений $[\eta]$ и s^v .

19.5. Анализ конформации одноцепочечных полинуклеотидов

На примере одиоцепочечных полинуклеотидов хорошо прослеживается связь между гидродинамическими свойствами и конформацией цепи. Статистический анализ конфигураций полинуклеотидной цепи — задача гораздо более трудная, чем в случае полипептидов. Каждое повторяющееся (мономерное) звено содержит шесть связей основной цепи, так что расчет конформационных энергий, которые являются функциями углов внутреннего вращения, весьма непросто (см. гл. 6). Тем не менее вычисление $\langle r^2 \rangle_0$ проводят по той же схеме, что и в рассмотренном ранее случае полипептидов (гл.18), с некоторыми отличиями, обусловленными большей сложностью полинуклеотидов. Здесь мы не будем приводить этих расчетов, а рассмотрим лишь основные результаты таких расчетов и сопоставим их с экспериментальными данными.

Для ряда одноцепочечных полинуклеотидов сведения о размерах молекул были получены на базе измерения светорассеяния, характеристической вязкости и коэффициента седи-

¹ Уравнения (19.28) и (19.29) были первоначально получены Манделькерном и Флори (Mandelkern, Flory, 1952) и проверялись на полимерах, имеющих конформацию статистического клубка. Шерага и Манделькерн (Shetaga, Mandelkern, 1953) затем показали, что уравнением (19.29) можно пользоваться при работе с глобулярными белками, моделируемыми эллипсоидом вращения; в этом случае величина β_s зависит от величины отношения осей эллипсоида (см. гл. 12).

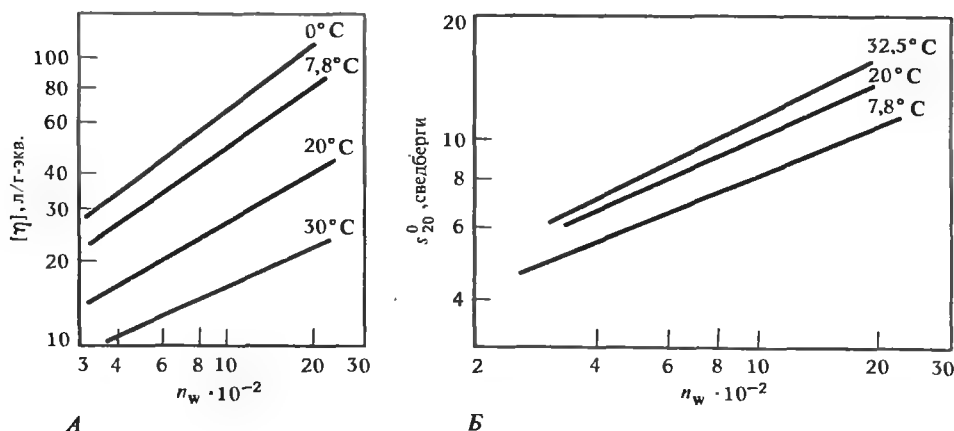


РИС. 19.3. Зависимость характеристической вязкости и коэффициента седиментации от длины цепи poly(A). А. Графики зависимости $[\eta]$ от n_w в двойных логарифмических координатах для poly(A); 1 M NaCl, 0,01 M фосфат натрия (pH 7,5). Б. Графики зависимости s_{20}^0 от n_w в двойных логарифмических координатах для poly(A); 1 M NaCl, 0,01 M фосфат натрия (pH 7,5). (Eisenberg H., Felsenfeld G., J. Mol. Biol., **30**, 17, 1967.)

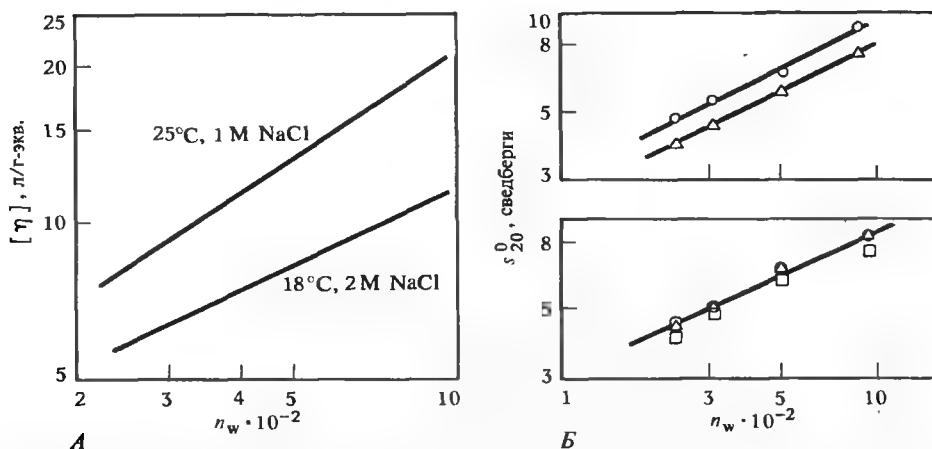


РИС. 19.4. Зависимость характеристической вязкости и коэффициента седиментации от длины цепи poly(U). А. Графики зависимости $[\eta]$ от n_w в двойных логарифмических координатах для poly(U) в 0,01 M натрий-фосфатном буфере (pH 7,1), отвечающие двум разным наборам параметров, характеризующих состояние раствора. Б. Графики зависимости s_{20}^0 от n_w в двойных логарифмических координатах для poly(U) в различных условиях (разные символы отвечают разным условиям). (Inners L. D., Felsenfeld G., J. Mol. Biol., **50**, 373, 1970.)

ментации. На рис. 19.3 приведены графики зависимости $\lg[\eta]$ и $\lg s^0$ от $\lg n_w$ для полиадениловой кислоты при разных значениях параметров, характеризующих состояние раствора (n_w — средневесовая длина цепи). На рис. 19.4 представлены аналогичные графики для полиуридиловой кислоты. Согласно полученным данным, связь между $\lg[\eta]$ или $\lg s^0$ и

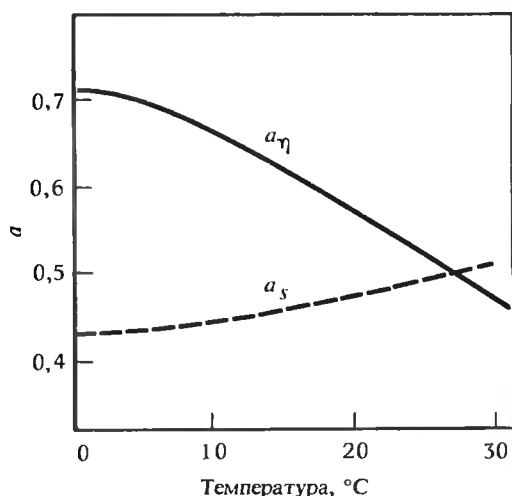


РИС. 19.5. Зависимость показателей степени a_η и a_s от температуры для полиадениловой кислоты. (Eisenberg H., Felsenfeld G., J. Mol. Biol., 30, 17, 1967.)

$\lg n_w$ превосходно описывается линейной зависимостью. Таким образом, $[\eta] = K_\eta n_w^{a_\eta}$ и $s^0 = K_s n_w^{a_s}$, где коэффициенты пропорциональности K_η и K_s и показатели степени a_η и a_s зависят от состава буфера и параметров, характеризующих его состояние. Из приведенного выше гидродинамического анализа очевидно, что x из уравнения (19.19) можно отождествить с a_η , а показатель $1 - a$ из уравнения (19.22) эквивалентен a_s . На рис. 19.5 приведены графики зависимости a_η и a_s от температуры для полиадениловой кислоты. И тот и другой параметр монотонно и плавно изменяется с ростом температуры. Кривые пересекаются при $a_\eta = a_s \approx 0,5$ и температуре около 27°C. Эта температура очень близка к Θ -температуре данной системы, определенной другим способом.

Анализ этих и других данных показывает, что в отсутствие стэкинг-взаимодействий (стэкинга) между основаниями предел, к которому стремится величина $\langle r^2 \rangle_0 / nl^2$ для полиадениловой, полиуридиловой и апуриновой кислот (последняя представляет собой полидезоксирибонуклеиновую кислоту, у которой удалены почти все пуриновые остатки), лежит в диапазоне от 10 до 15. Параметр l^2 ($\sim 2,3 \text{ \AA}^2$) дает среднеквадратичное значение длины связи. Для сравнения укажем, что предельное характеристическое отношение $\langle r^2 \rangle_0 / nl^2$ для поли-L-аланина равно 20, если в основе расчета лежит величина l^2 , и 9, если в нем используются значения длин виртуальных связей (табл. 18.1).

Теоретические расчеты, в которых все стерически возможные конформации считаются равновероятными, дают для характеристического отношения значения, лежащие в диапазоне 2,0 — 4,5, что сильно расходится с экспериментальными данными (Olson, Flory, 1972). Этот факт указывает на то, что энергетические различия между стерически возможными конформациями должны приводить к более вытянутой конформации цепи. Если провести расчет конформационных энергий и учесть эти оценки при вычислении размеров клубка, то получаются гораздо большие предельные значения характеристического отношения. Для цепей, в которых все рибозные кольца имеют конфигурацию $C^{3'}$ -эндо, получаем $(\langle r^2 \rangle_0 / nl^2)_{n \rightarrow \infty} \approx 9$. Для цепей, где все кольца имеют конфигурацию $C^{2'}$ -эндо, $(\langle r^2 \rangle_0 / nl^2)_{n \rightarrow \infty} \approx 25$. Эти результаты легко согласовать с экспериментальными данными, если рассматривать цепь как статистический сополимер из мономерных единиц с конфигурацией рибозы соответственно $C^{2'}$ -эндо и $C^{3'}$ -эндо (Olson, Flory, 1972). К сожалению, для цепи из мономеров с конфигурацией рибозы $C^{2'}$ -эндо характеристическое отношение сильно зависит от угла поворота вокруг связи $C^{3'} - O^{3'}$, поэтому трудно дать точную интерпретацию экспериментально наблюдаемым величинам.

19.6. Конформация ДНК

Согласно результатам многочисленных исследований, двухцепочечная молекула ДНК при больших молекулярных массах не имеет формы абсолютно жесткого стержня и ведет себя как очень жесткая, червеобразная цепь. Это означает, что при небольшой длине цепи молекула стержнеобразна, но при большой контурной длине цепь постепенно искривляется и изгибается в произвольных направлениях.

Изучению гидродинамического поведения ДНК было посвящено несколько блестящих теоретических и экспериментальных исследований, и им мы обязаны многим из того, что известно в настоящее время о конформации ДНК в растворе. На рис. 19.6 приведены графики зависимости $\lg s^0$ и $\lg[\eta]$ от $\lg M$ для двухцепочечной ДНК, выделенной из разных организмов, в диапазоне M от 300 000 до 10^8 . Так как молекулярная масса пары оснований равна примерно 600, то этот диапазон соответствует молекулам с длиной цепи примерно от 500 до 165 000 пар оснований. В этом широком диапазоне молекулярных масс обе зависимости нелинейны, как можно видеть из графиков. Однако, зная точный вид зависимости s^0 и $[\eta]$ от M в различных участках этого диапазона, можно извлечь отсюда ряд полезных сведений. На участке от $M = 3 \cdot 10^5$ до $M = 2 \cdot 10^6$ измеренные значения вязкости удовлетворяют соотношению $[\eta] = K_\eta M^{1,32}$. Показатель степени 1,32 приближается к значению 1,8 для абсолютно жесткого стержня (табл. 19.1), хотя и не достигает его. В области значений M , больших $2 \cdot 10^6$, получаем $[\eta] = K'_\eta M^{0,70}$, где $K'_\eta \neq K_\eta$. Здесь зависимость $[\eta]$ от M имеет вид, предсказываемый для клубкообразных молекул (табл. 19.1).

Таким образом, из приведенных выше вискозиметрических данных следует, что вплоть до $M \approx 10^6$ цепные молекулы ДНК квазистержеобразны, но в области больших молекулярных масс они ведут себя скорее как клубкообразные молекулы. Такая интерпретация согласуется и с седиментационными данными. На отрезке от $M = 3 \cdot 10^5$ до $M = 4 \cdot 10^6$ мы имеем $s^0 = K_s M^{0,325}$, тогда как выше $M = 4 \cdot 10^6$ зависимость имеет вид $s^0 = K'_s M^{0,405}$. Таким образом, поведение коэффициента седиментации также изменяется: в области M , меньших $M \approx 10^6$, оно соответствует квазистержеобразным молекулам, при больших молекулярных массах — квазиклубкообразным молекулам (см. табл.19.2). Приведенные выше результаты седиментационных и вискозиметрических измерений служат прекрасной иллюстрацией к понятию жесткой цепи.

Мы можем воспользоваться упомянутыми данными по седиментации и вязкости для вычисления β_s [уравнение (19.29)]. Значение этого параметра приблизительно равно $1,2 \cdot 10^7$ во всем диапазоне молекулярных масс, показанном на рис. 19.6. Вообще говоря,

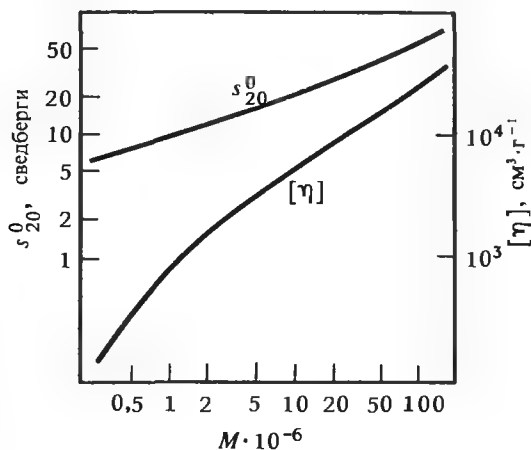


РИС. 19.6. Найденные экспериментально зависимости коэффициента седиментации и характеристической вязкости двухцепочечной ДНК от молекулярной массы. (Eigner J., Doty P., J. Mol. Biol., 12, 549, 1965.)

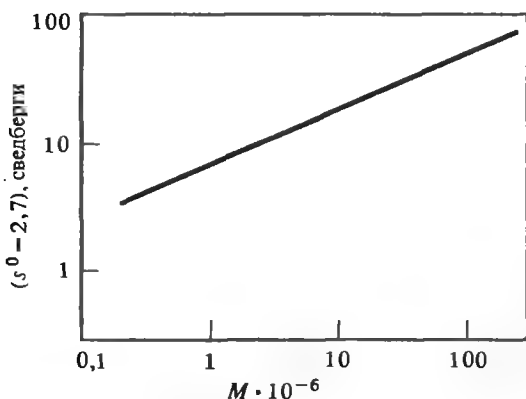


РИС. 19.7. Иллюстрация единой функциональной зависимости между коэффициентом седиментации и молекулярной массой. График строится в координатах $\lg M$, $\lg(s^0 - 2,7)$. (Crothers D. M., Zimm B. H., J. Mol. Biol., 12, 525, 1965.)

следует ожидать, что β_s будет несколько отличаться от этого значения в низкомолекулярной области упомянутого диапазона ($M < 10^7$), поскольку в этой области молекула ДНК не является истинным клубком. Однако величина β_s меняется незначительно, и то, что для молекулы ДНК она практически совпадает со средним значением β_s , полученным для разных по химическому составу полимеров, которые перечислены в табл. 19.3, лишний раз подтверждает правильность гидродинамической трактовки s^0 и $[\eta]$ в разд. 19.4.

Согласно результатам теоретического анализа коэффициента седиментации идеализированной червеобразной цепи, не учитывающего влияния объемных эффектов, связь между s^0 и M описывается соотношением $s^0 = b + K_s M^{1/2}$, где b — постоянная (Hearst, Stockmayer, 1962). Таким образом, полученные в рамках данной теории результаты предсказывают, что введение постоянной в качестве дополнительного члена в общее соотношение $s^0 = K_s M^{1/2} - a$ [см. уравнение (19.22)] позволит охватить все данные по седиментации одним уравнением, в котором $a = 1/2$. Это предсказание в общем подтверждается экспериментальными данными во всем диапазоне молекулярных масс от $2 \cdot 10^5$ до $1,3 \cdot 10^8$. На рис. 19.7 представлен график зависимости $\lg(s^0 - b)$ от $\lg M$, охватывающий весь этот диапазон M . Оптимальное значение b составляет 2,7, что хорошо согласуется с теоретической оценкой этого параметра. Точки хорошо ложатся на прямую, но наклон ее равен 0,445, а не 0,500. Это расхождение, однако, можно объяснить влиянием объемных эффектов (Gray et al., 1967). Теоретический анализ данных по седиментации приводит также к оценке $\sim 450 \text{ \AA}$ для персистентной длины (см. гл. 18) ДНК при ионной силе $\sim 0,2 \text{ M}$ (Hearst, Stockmayer, 1962; Gray et al., 1967)¹.

19.7. Модель для случая жестких цепей: цепь Порода — Кратки

При описании жестких цепей иногда пользуются терминологией абстрактной модели, известной как цепь Порода — Кратки (ПК-цепь) (см. Kratky, Porod, 1949). Конформация ДНК

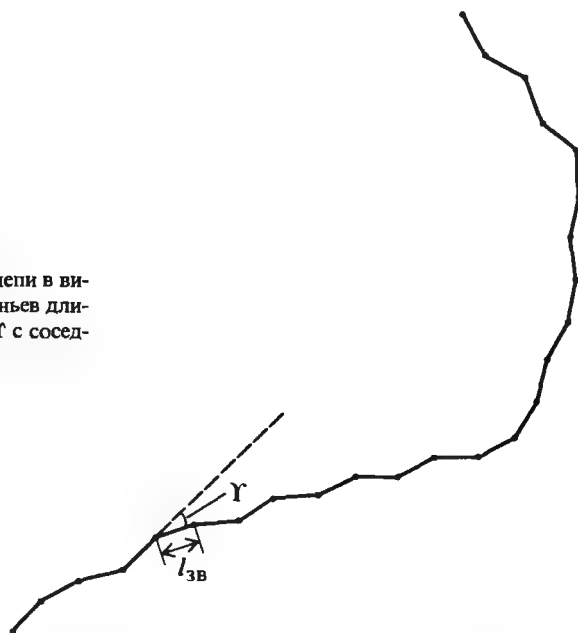
¹ В последние годы были проведены измерения персистентной длины двухцепочечной молекулы ДНК с использованием строго монодисперсных препаратов молекул ДНК различной длины в условиях, когда было исключено влияние объемных эффектов. Эти измерения привели к надежной оценке персистентной длины, составляющей $500 \pm 50 \text{ \AA}$ при ионной силе 0,2 M. С уменьшением ионной силы ниже 10^{-3} M наблюдается резкий рост персистентной длины (см. Kovacic R. T., van Holde K. E., Biochem., 16, 1490, 1977; Hagerman P. J., Biopol., 20, 1503, 1981). — Прим. ред.

была представлена этой моделью в рамках задачи о гидродинамическом поведении полимерных цепей. ПК-модель рассматривает клубок, образованный плавно изгибающейся нитью, в отличие от изломанного контура очень гибких цепей (например, у полиглицина). При этом считают, что направление касательной в каждой точке нити случайно.

МОДЕЛЬ ПОРОДА — КРАТКИ

На рис. 19.8 дано схематическое изображение ПК-цепи. Ее представляют как последовательность из x гипотетических звеньев длины $l_{зв}$, каждое из которых образует угол T с соседними звеньями (угол, дополнительный к «валентному углу»). Случайный характер изгибов траектории цепи является следствием того, что вокруг каждого из гипотетических звеньев возможно свободное вращение соседних звеньев. Поэтому средняя проекция ρ вектора $\mathbf{r}$, соединяющего концы цепи, на направление первого звена (см. гл.18) определяется равенством ¹

РИС. 19.8. Представление червеобразной цепи в виде последовательности гипотетических звеньев длины $l_{зв}$, каждое из которых образует угол T с соседними звеньями.



¹ Соединяющий концы цепи вектор $\mathbf{r} = \sum \mathbf{l}_i'$, где $\mathbf{l}_i'$ — гипотетическое звено в векторном представлении [уравнение (18.1)]; здесь знак «штрих» используется для того, чтобы отличить гипотетические звенья от истинных связей, а сумма берется от $i = 1$ до $i = x$. Длины всех звеньев одинаковы и равны $l_{зв}$. Воспользовавшись результатами, полученными при рассмотрении модели цепи со свободным вращением (разд. 18.4), получаем

$$\begin{aligned} \langle (l_1'/l_{зв}) \cdot \mathbf{r} \rangle &= \langle (l_1'/l_{зв}) \cdot \mathbf{l}_1' + (l_1'/l_{зв}) \cdot \mathbf{l}_2' + \dots + (l_1'/l_{зв}) \cdot \mathbf{l}_x' \rangle = \\ &= l_{зв} [1 + \cos T + (\cos T)^2 + \dots + (\cos T)^{x-1}] \end{aligned}$$

$$\rho = l_{3B} \sum_{k=0}^{x-1} (\cos \Upsilon)^k \quad (19.30)$$

В случае бесконечной цепи $x \rightarrow \infty$, а $\rho \rightarrow a$ (a — персистентная длина; см. гл. 18), сумма же сходится в пределе к $(1 - \cos \Upsilon)^{-1}$; в результате имеем

$$a = l_{3B} / (1 - \cos \Upsilon) \quad (19.31)$$

Обратимся вновь к уравнению (19.30); пусть теперь l_{3B} становится все меньше и меньше, но при этом персистентная длина a и контурная длина L_K остаются постоянными, равными своим заранее заданным значениям. Поэтому по мере уменьшения l_{3B} изменение траектории цепи за счет одного звена становится все меньше; это означает, что Υ уменьшается, разность $1 - \cos \Upsilon$ должна стремиться к нулю и, конечно, x стремится к бесконечности. В соответствии с уравнением (19.31) получаем

$$\lim_{l_{3B} \rightarrow 0} [l_{3B} / (1 - \cos \Upsilon)] = \lim_{l_{3B} \rightarrow 0} \{l_{3B} / [-\ln(\cos \Upsilon)]\} = a \quad (19.32)$$

где мы воспользовались соотношением $\ln x \cong x - 1$ в окрестности точки $x = 1$. С помощью описанной выше процедуры мы, таким образом, превращаем нашу цепь в нить с *плавной изменяющейся* кривизной, касательная к которой в каждой точке направлена случайным образом. Уравнение (19.32) так определяет l_{3B} и $\cos \Upsilon$, что $\cos \Upsilon = \exp(-l_{3B}/a)$. Отсюда, согласно уравнению (19.30),

$$\rho = l_{3B} \sum_{k=0}^{x-1} \exp(-kl_{3B}/a) \quad (19.33)$$

Так как l_{3B} становится весьма малой величиной, сумму мы можем заменить интегралом, в котором, поскольку x велико, заменим $x - 1$ на x и определим далее $L = l_{3B}k$ как непрерывную переменную:

$$\rho = l_{3B} \int_0^x \exp(-kl_{3B}/a) dk \quad (19.34)$$

$$= \int_0^{L_K} e^{-L/a} dL \quad (19.35)$$

$$= a(1 - e^{-L_K/a}) \quad (19.36)$$

где при переходе от уравнения (19.34) к уравнению (19.35) мы воспользовались соотношением $dL = l_{3B} dk$.

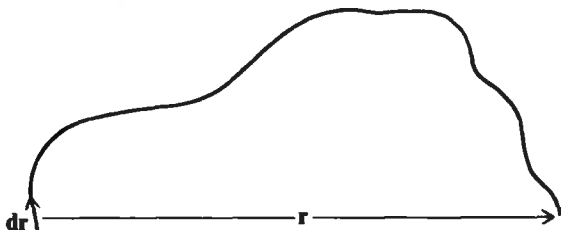
Связь между $\langle r^2 \rangle_0$ и L_K получим, заметив, что $\mathbf{r} \cdot d\mathbf{r} = \rho dL_K$. Это с очевидностью следует из рис. 19.9, где в начале цепи, продолжая ее, добавлен сегмент $d\mathbf{r}$ (направленный так же, как первое звено). Таким образом,

$$d\langle \mathbf{r} \cdot \mathbf{r} \rangle = 2\langle \mathbf{r} \cdot d\mathbf{r} \rangle \quad (19.37)$$

$$= 2\rho dL_K \quad (19.38)$$

$$= 2a(1 - e^{-L_K/a}) dL_K \quad (19.39)$$

РИС. 19.9. Добавление сегмента dr в начало цепи. [См. уравнение (19.37) и текст к нему.]



$$\langle r^2 \rangle_0 = 2a \int_0^{L_k} (1 - e^{-L/a}) dL \quad (19.40)$$

$$= 2aL_k [1 - a/L_k (1 - e^{-L_k/a})] \quad (19.41)$$

Уравнение (19.41) и есть искомый результат. В пределе, для больших L_k ,

$$(\langle r^2 \rangle_0 / L_k)_{L_k \rightarrow \infty} = 2a \quad (19.42)$$

[Заметим, что формально уравнение (19.42) можно вывести из уравнения (18.71), заменив в последнем nl на L_k и l на $l_{эв}$ и имея в виду, что $l_{эв}$ — бесконечно малая величина.] При малых L_k правую часть уравнения (19.41) можно представить в виде ряда по степеням L_k/a для $L_k/a < 1$:

$$\langle r^2 \rangle_0 = L_k^2 [1 - 1/3(L_k/a) + 1/12(L_k/a)^2 - \dots] \quad (19.43)$$

СВЯЗЬ МЕЖДУ ДЛИНОЙ И РАЗМЕРАМИ ЧЕРВЕОБРАЗНОЙ ЦЕПИ

Если $L_k \ll a$, то, согласно уравнению (19.43), $\langle r^2 \rangle_0 \cong L_k^2$, т.е. расстояние между концами невозмущенной цепи равно ее контурной длине. Именно так ведет себя стержнеобразная молекула; таким образом, при малой контурной длине жесткая нить подобна стержню по своим гидродинамическим свойствам. Однако по мере увеличения L_k начинает выполняться условие $\langle r^2 \rangle_0 < L_k^2$ [см. уравнение (19.43)], поскольку становится заметным эффект кривизны. При достаточно больших L_k выполняется равенство $\langle r^2 \rangle_0 / L_k^2 = 2a/L_k$ [уравнение (19.42)], т.е. отклонение $\langle r^2 \rangle_0$ от значения, ожидаемого в случае стержня, определяется величиной отношения персистентной длины к контурной длине цепи.

ПРИЛОЖЕНИЕ МОДЕЛИ ПОРОДА — КРАТКИ К ДНК

В случае двойной спирали Уотсона — Крика каждый виток спирали проходит вдоль оси расстояние 34 Å. Поскольку на один виток приходится 10 пар оснований, смещение вдоль оси при сдвиге на одну пару составляет 3,4 Å. Эти данные лежат в основе расчета L_k по известному числу пар оснований. Согласно такой оценке, контурная длина цепи, содержащей 1 000 пар оснований ($M \cong 600\,000$), составляет 3400 Å, или 0,34 мкм. Выше мы приводили примерную оценку персистентной длины (450 Å), справедливую для определенных условий, в которых находятся молекулы ДНК. Теперь мы можем вычислить то значение контурной длины, ниже которого ДНК в растворе ведет себя как стержнеобразная молекула ($\langle r^2 \rangle_0 \geq 0,9L_k^2$, или $\langle r^2 \rangle_0^{1/2} \geq 0,95L_k$); ему соответствует, согласно урав-

нению (19.43), величина $(1/3)(L_k/a) = 0,1$; отсюда находим $L_k = 0,3a = 135 \text{ \AA}$, что отвечает примерно 40 парам оснований. При больших молекулярных массах $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ и L_k очень сильно отличаются друг от друга. Возьмем в качестве примера ДНК бактериофага Т2, контурная длина которой составляет 60 мкм. При значении персистентной длины 450 $\text{\AA}$ величина $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$, вычисленная по формуле (19.41) или (19.42), составляет 2,3 мкм.

Краткие выводы

Гидродинамические свойства полимеров тесно связаны с конформацией полимерной цепи. В частности, существует корреляция между характеристической вязкостью статистических клубков и среднеквадратичным расстоянием между концами цепи, поэтому измерение вязкости представляет собой удобный способ оценки размеров полимерных молекул, имеющих конформацию клубка. Коэффициент трения и коэффициент седиментации также тесно связаны с размерами молекулы полимера. Более того, зная зависимость характеристической вязкости (или коэффициентов трения или седиментации) от молекулярной массы, можно определить, ведет ли себя полимерная цепь как статистический клубок или ее поведение отвечает другой модели. Наконец, некоторые из гидродинамических параметров взаимосвязаны через коэффициент Манделькерна — Флори — Шераги; эта связь оказывается особенно полезной в том отношении, что позволяет вычислять молекулярные массы на основе седиментационно-вязкостных данных.

Гидродинамические методы применяли при изучении как одно-, так и двухцепочечных нуклеиновых кислот. Расчеты, основанные на статистической модели конфигурации цепи в приложении к одноцепочечным полинуклеотидам, довольно хорошо согласуются с наблюдаемыми в опыте размерами их цепей. В случае двухцепочечной ДНК исследовали, в частности, характер зависимости характеристической вязкости и коэффициента седиментации от молекулярной массы. Результаты этих исследований показывают, что молекулы ДНК, молекулярные массы которых не превышают примерно 10^6 , ведут себя как квазистержеобразные молекулы и что молекулы с большей массой больше похожи на клубок. Это заставляет предположить, что двойная спираль ДНК подобна по своим гидродинамическим свойствам жесткой червеобразной нити. Такие цепи удобно рассматривать, пользуясь моделью, известной как цепь Порода — Кратки. Эта модель оказывается весьма полезной при описании конформации и размеров молекул ДНК.

Задачи

19.1. Вычислите радиус r_g эквивалентной гидродинамической сферы, коэффициент седиментации которой равен коэффициенту седиментации статистического клубка, если известно, что величина $\langle r^2 \rangle$ статистического клубка в водном растворе составляет $10^4 \text{ \AA}^2$. (Считайте, что парциальные удельные объемы статистического клубка и эквивалентной сферы одинаковы.)

19.2. Допустим, что некий исследователь изучает, как зависят седиментационно-вязкостные свойства полимера от его молекулярной массы, и получает любопытный результат: величина $s^0 [\eta]^{1/3}$ пропорциональна $M^{1/3}$. «Это, должно быть, означает, что мой полимер, в общем-то, представляет собой жесткую сферу!» — восклицает он. «Совсем не обязательно, — говорит Джо Умник. — Существует еще одно простое объяснение полученного тобой результата». И тут Салли Сообразительная заявляет: «Конечно, это никакая не жесткая сфера!». Кто тут прав (если есть такой) и почему?

19.3. Пусть у нас имеется полимерная цепь с большим числом звеньев. Конформационная энергия этой цепи задается равенством $U(r) = \alpha r^2$, где r — расстояние между концами цепи, а α — постоянный коэффициент, имеющий размерность энергии, поделенной на квадрат длины. Число конформаций цепи, для которых величина r заключена в пределах между r и $r + dr$, пропорционально $4\pi r^2$. а) Выведите выражение для $\langle r^2 \rangle$, которое является функцией α и T (температуры), считая, что r может изменяться в интервале от 0 до ∞ . б) При измерении характеристической вязкости такой цепи получена величина $90 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$ при 300 К. Пользуясь этими данными, вычислите величину $\langle r^2 \rangle^{1/2}$, выразив ее в ангстремах, и определите коэффициент α . Будем считать, что мол. масса цепи равна 10^5 .

19.4. В основном тексте сообщалось, что при вычислении величины $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ для ДНК фага Т2 были использованы значения 450 Å для персистентной длины и 60 мкм для контурной длины в сочетании с моделью Порода — Кратки. Выполните эти расчеты и сравните ваш результат с тем, что приведен в тексте.

19.5. Молекулярная масса полимера, имеющего конформацию статистического клубка, составляет 10^7 , а его контурная длина равна 30 000 Å. Измеряя характеристическую вязкость этого полимера, получили для некоторых фиксированных условий величину $540 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Пользуясь этими сведениями, найдите персистентную длину.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Flory P. J., 1953. Principles of Polymer Chemistry. Ithaca, N. Y. Cornell Univ. Press. [В гл. 14 приведен глубокий теоретический анализ гидродинамических свойств полимеров в разбавленных растворах.]
- Tanford C., 1961. Physical Chemistry of Macromolecules, New York, Wiley. [Имеется перевод: Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1965. В гл. 6 рассматриваются вязкость, седиментация и диффузия как глобулярных частиц (белки), так и гибких полимерных цепей.]
- Yamakawa H., 1971. Modern Theory of Polymer Solutions, New York, Harper and Row. [Углубленное изложение теории.]

Специальная

- Crothers D. M., Zimm B. H., 1965. Viscosity and sedimentation of the DNA from bacteriophages T2 and T7 and the relation to molecular weight, J. Mol. Biol., **12**, 525.
- Debye P., 1946. Viscosity of polymer solutions, J. Chem. Phys., **14**, 636.
- Debye P., Bueche A. M., 1948. Intrinsic viscosity, diffusion, and sedimentation rate of polymers in solution, J. Chem. Phys., **16**, 573.
- Eigner J., Doty P., 1965. The native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid, J. Mol. Biol., **12**, 549.
- Gray H. B., Jr., Bloomfield V. A., Hearst J. E., 1967. Sedimentation coefficients of linear and cyclic wormlike coils with excluded-volume effects, J. Chem. Phys., **46**, 1493.
- Gray H. B., Jr., Hearst J. E., 1968. Flexibility of native DNA from the sedimentation behavior as a function of molecular weight and temperature, J. Mol. Biol., **35**, 111.
- Harington R., 1978. Opticohydrodynamic properties of high-molecular-weight DNA. III. The effects of NaCl concentration, Biopolymers, **17**, 919. [Исследование исключенного объема и персистентной длины ДНК фага Т2 в некотором диапазоне концентраций соли. ¹]

¹ Данные, полученные в этой работе, подверглись в дальнейшем существенному уточнению в работах Слонизко С. В., Фрисман Э. В., Молек. биол., **14**, 496, 1980; Hagerman P., Biopol., **20**, 1503, 1981. — Прим. ред.

- Hearst J. E., Stockmayer W. H., 1962. Sedimentation constants of broken chains and wormlike coils, J. Chem. Phys., **37**, 1425.
- Kirkwood J. G., Riseman J., 1948. The intrinsic viscosities and diffusion constants of flexible macromolecules in solutions, J. Chem. Phys., **16**, 565.
- Kratky O., Porod G., 1949. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. Rec. Trav. Chim., **68**, 1106.
- Mandelkern L., Flory P. J., 1952. The frictional coefficient for flexible chain molecules in dilute solution, J. Chem. Phys., **20**, 212.
- Olson W. K., Flory P. J., 1972. Spatial configurations of polynucleotide chains, I: Steric interactions in polyribonucleotides: A virtual bond model, Biopolymers, **11**, 1.
- Olson W. K., 1972. Spatial configuration of polynucleotide chains, II: Conformational energies and the average dimensions of polyribonucleotides, Biopolymers, **11**, 25.
- Roberts T. M., Lauer G. D., Klotz L. C., 1975. Physical studies on DNA from "primitive eucaryotes", CRC Critical Reviews in Biochemistry, **3**, 349.
- Scheraga H. A., Mandelkern L., 1953. Consideration of the hydrodynamic properties of proteins, J. Am. Chem. Soc., **75**, 179.
- Weissman M., Schindler H., Feher G., 1976. Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: Application to DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2776.
- Zimm B. H., 1956. Dynamics of polymer molecules in dilute solution: Viscoelasticity, flow birefringence and dielectric loss, J. Chem. Phys., **24**, 269.

Глава 20 Конформационное равновесие в полипептидах и белках: переход спираль — клубок

20.1. Конформационная стабильность и конформационные изменения

Несмотря на доступность обширного конфигурационного пространства, белки и полипептиды обладают удивительной способностью принимать строго определенные конформации. Эти упорядоченные конформации очень разнообразны: с одной стороны, это компактные глобулярные частицы, с другой — фибриллярные стержнеподобные молекулярные структуры. Факторы, ответственные за стабилизацию упорядоченных структур, детально обсуждаются в гл. 5.

В растворе могут существовать разные стабильные упорядоченные формы, и при определенных условиях полипептиды могут переходить из одной такой формы в другую или из упорядоченной конформации в какую-либо неупорядоченную. Такие конформационные переходы обычно осуществляются в ответ на изменение внешних условий (например, температуры или состава растворителя) и нередко происходят при весьма небольшом изменении этих условий. Структурные перестройки можно исследовать, наблюдая за изменением физических свойств полипептидов и белков, например за дисперсией оптического вращения, круговым дихроизмом или гидродинамическим поведением.

Разнообразие возможных структурных изменений в белках и полипептидах можно проиллюстрировать несколькими примерами. На рис. 20.1 приведены спектры ДОВ в УФ-области для случайных сополимеров гидроксипропил-L-глутамина и L-аланина при 5°C (кривые А, Б, В) и при 76°C (кривые А', Б', В'). Три кривые при каждой температуре соответствуют полимерам с разной длиной и составом цепей. Поразительно, как сильно изменяется вид кривых при увеличении температуры. Спектры, полученные при 5°C, характерны для α -спиральных структур; наибольшей степенью спиральности обладает образец В. При 76°C полимеры находятся в неупорядоченной конформации и их оптическое вращение мало. В интервале между этими двумя крайними температурами осуществляется переход спираль — клубок. В последующих разделах этой главы детально рассмотрен вопрос о переходе спираль — клубок в полипептидах.

На рис. 20.2, А приведены спектры ДОВ в ультрафиолетовой и видимой областях для конформационных форм I и II поли-L-пролина. Эти структуры представляют собой довольно жесткие спирали с имидной связью в *цис*-положении в форме I и в *транс*-положении в форме II (рис. 20.2, Б). Структура стабилизирована строгими стереохимическими ограничениями и взаимодействиями полимер — растворитель. Из-за отсутствия амидной группы N — H внутримолекулярные водородные связи не образуются. При изменении состава растворителя легко происходят взаимные превращения форм I и II. На рис. 20.2, В представлена зависимость $[\phi]_{546}$ от состава растворителя. Из этого рисунка видно, что в области перехода, происходящего при небольшом изменении состава растворителя, наблюдается резкое изменение оптического вращения. Следует отметить, что структура и конформационные изменения поли-L-пролина интересны прежде всего потому, что они связаны со структурой и функцией коллагена.

Другие очень интересные и весьма существенные структурные перестройки происходят в поли-L-лизине при щелочных pH, когда ϵ -аминогруппы не протонированы. При этих условиях могут формироваться упорядоченные межмолекулярные и внутримолекулярные

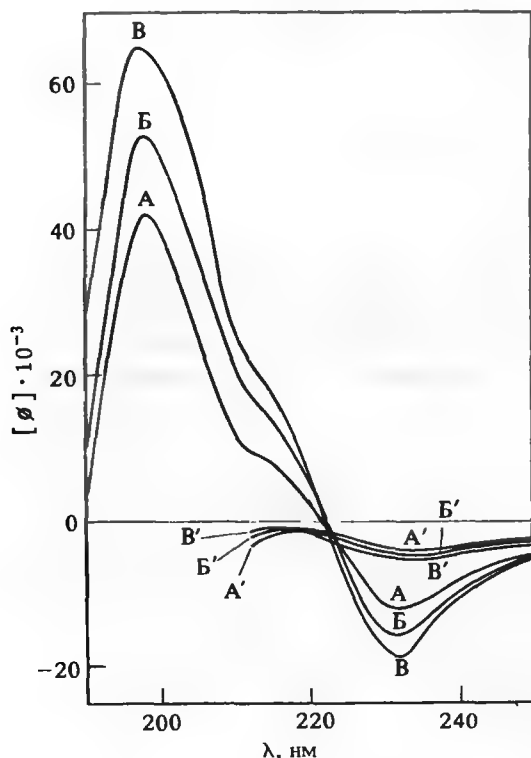
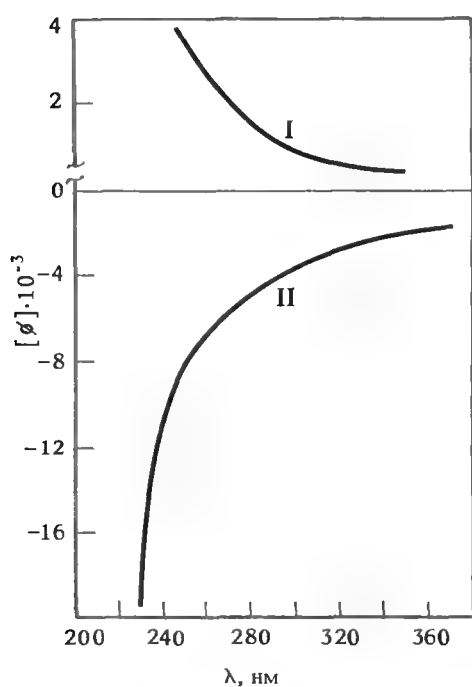


РИС. 20.1. Конформационные изменения в полипептидах. Спектры ДОВ в ультрафиолетовой области случайных сополимеров гидроксипропил-L-глутамата и L-аланина при 5°C (кривые А, Б, В) и при 76°C (кривые А', Б', В'). Три кривые при каждой температуре соответствуют сополимерам с разной длиной цепи (степень полимеризации 422, 536 и 1102) и составом (14, 30 и 49% аланина). (Platzter K. E. B. et al., *Macromolecules*, 5, 177, 1972.)

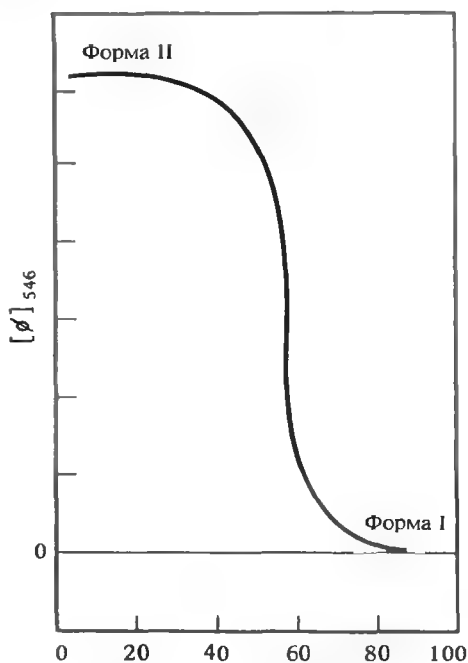
структуры. На рис. 20.3, А представлены спектры ДОВ поли-L-лизина. При 22,5°C наблюдается спектр, характерный для правой α -спирали (см. гл. 8). Если раствор в течение некоторого времени выдерживать при температуре 51°C, то по мере формирования новой структуры будет происходить постоянное изменение спектра ДОВ. Новая структура, которая при этом образуется, может быть стабилизирована путем охлаждения раствора до 22,5°C. Ее спектр ДОВ, также представленный на рис. 20.3, характерен для β -слоя. Таким образом, поли-L-лизин может переходить из одной упорядоченной формы в другую — из спирали, стабилизированной внутримолекулярными связями, в агрегат, стабилизированный межмолекулярными взаимодействиями.

Имея в виду все сказанное выше, легко представить, что существенные структурные перестройки могут происходить и в белках. При этом изменение биологической активности белков нередко наблюдается даже в тех случаях, когда структурные изменения невелики. На рис. 20.4 представлены спектры кругового дихроизма β -лактоглобулина, снятые в дальней ультрафиолетовой области, для нативного белка и для белка с разной степенью денатурации. На вставке приводится спектр, полученный в подкисленном метаноле, который характерен для белков со значительным содержанием α -спиралей. Спектральные изменения в этом случае столь же значительны, как и для полипептидов, однако связать их со спектрами каких-либо конкретных структур значительно труднее.

В настоящей главе детально обсуждается один из примеров конформационных изменений — переход спираль — клубок в полипептидах, который исследован лучше других как в отношении эксперимента, так и теоретически. Изучение этого перехода во многом спо-

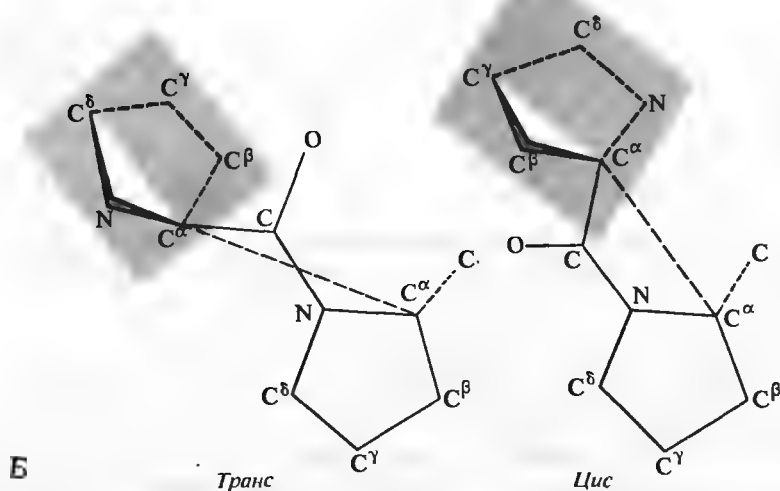


А



Концентрация н-пропанола, объемные проценты

В



Б

РИС. 20.2. Две конформационные формы поли-L-пролина. А. Спектры ДОВ двух конформаций. (Fasman G. D., Blout E. R., Biopolymers, 1, 3, 1963.) Б. Имидная связь в *цис*- и *транс*-положениях. В. Зависимость оптического вращения поли-L-пролина при 546 нм от состава растворителя, полученная для смеси уксусная кислота + н-пропанол. (Gornick F. et al., J. Am. Chem. Soc., 86, 2549, 1964.)

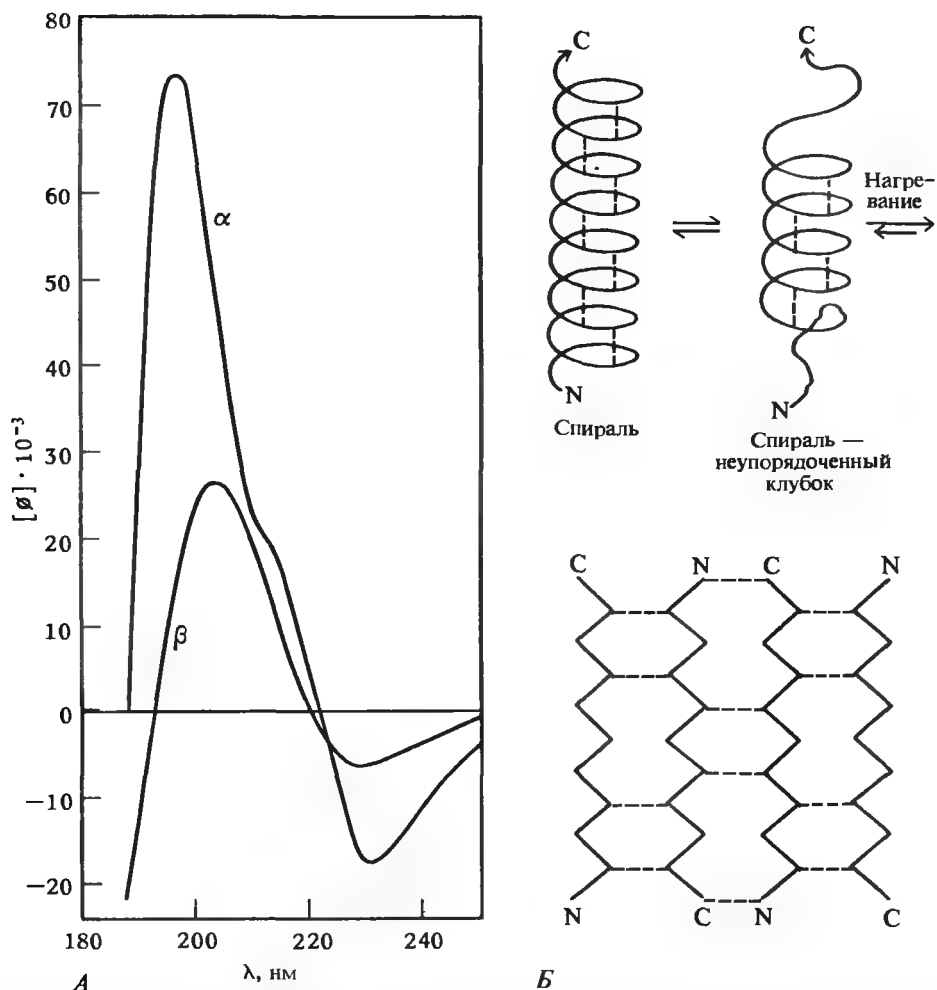


РИС. 20.3. Внутри- и межмолекулярная упорядоченность в поли-L-лизине. А. Спектры ДОВ α -спирали и β -слоя. Б. Схематическое изображение переходов от α -спирали к β -слою при повышении температуры. (Davidson B., Fasman G. D., *Biochemistry*, 6, 1616, 1967.)

собствовало пониманию свойств полипептидов и кооперативных явлений вообще. Очень много работ посвящено также обратимому сворачиванию — разворачиванию белковых молекул, однако до установления механизма этого процесса еще очень далеко (см. гл. 21). Исследования такого рода интересны не только потому, что они дают представления о факторах, стабилизирующих (и дестабилизирующих) нативную форму, но также и потому, что они проливают свет на механизм сборки специфических упорядоченных белковых комплексов из новосинтезированных полипептидных цепей. Хотя процессы сворачивания — разворачивания белков значительно более сложны, чем переход спираль — клубок в полипептидах, знакомство с последним в настоящей главе послужит полезной основой для понимания принципов организации белков.

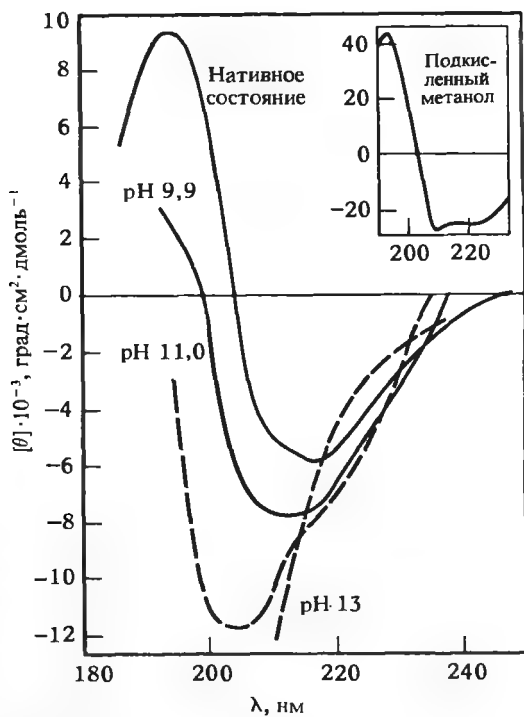


РИС. 20.4. Конформационные изменения в белке. Спектры КД в дальней ультрафиолетовой области β -лактоглобулина А в нативном и других состояниях. (Timasheff S. N. et al. In: Conformation of Biopolymers, vol. 1, ed. G. N. Ramachandran, New York, Academic Press, 1967, p. 173.)

Главная цель более глубокого рассмотрения этих двух конформационных переходов состоит в том, чтобы проиллюстрировать, какие вопросы могут при этом возникать и какие подходы могут быть использованы для их решения. Разумеется, многие из этих вопросов и подходов имеют достаточно общий характер и оказываются полезными при решении других задач.

20.2. Переход спираль — клубок: ранние исследования

Из рентгеновской кристаллографии, из инфракрасной спектроскопии, исследований оптического вращения, вязкости и многих других хорошо известно, что полипептиды могут принимать конформацию α -спирали как в кристаллическом состоянии, так и в растворе. Рис. 2.23 иллюстрирует структуру правой α -спирали, определенную с помощью рентгеноструктурного анализа. Эта структура стабилизирована системой водородных связей, в которой атом кислорода карбонильной группы i -го остатка связан с атомом водорода амидной группы $(i + 4)$ -го остатка. В рамках соглашения, рассмотренного в гл. 5, все углы вращения ϕ и ψ в спирали равны или -50° (правая спираль), или $+50^\circ$ (левая спираль) (см. табл. 5.2).

Как уже упоминалось, полипептиды образуют спиральные структуры и в растворе. Однако изменение температуры раствора, состава растворителя, pH часто приводят к значительным изменениям физических характеристик полипептидов. Рассмотрим, например, некоторые данные для поли-L-глутаминовой кислоты, полученные на ранних этапах ее исследования. Этот полимер содержит ионизируемые карбоксильные группы, так что его

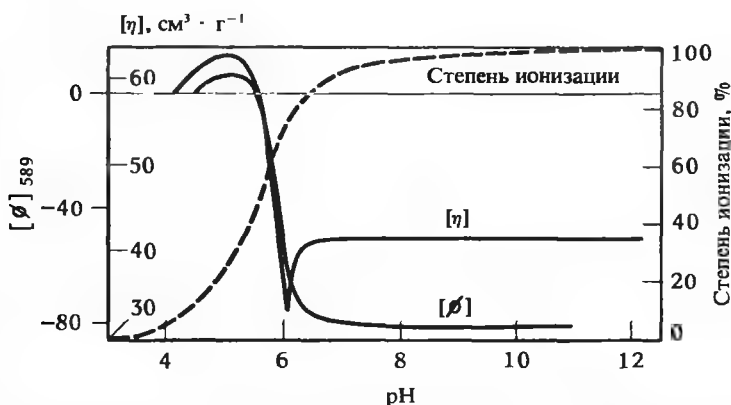


РИС. 20.5. Переход спираль — клубок в полипептиде. Зависимость удельного вращения, характеристической вязкости и степени ионизации от pH для поли-L-глутаминовой кислоты в смеси 0,2 M NaCl + диоксан (2:1) при 25°C. (Doty P. et al., J. Polymer Sci., 23, 851, 1957.)

суммарный заряд зависит от pH. Изменение заряда должно приводить к изменению конформации полимера, поскольку конфигурации, в которых ионизированные карбоксильные группы располагаются поблизости друг от друга, будут запрещены.

На рис. 20.5 представлены графики зависимости оптического вращения при 589 нм, характеристической вязкости и степени ионизации поли-L-глутаминовой кислоты от pH в смеси воды с диоксаном (диоксан способствует растворению незаряженных полипептидов). При увеличении pH в узком его диапазоне оптическое вращение и характеристическая вязкость резко меняются. Подобные изменения полностью согласуются с переходом от упорядоченной спиральной стержнеобразной структуры при низких pH к статистическому клубку при высоких pH. Напомним, что большая характеристическая вязкость свойственна молекулам с высокой молекулярной массой, имеющим форму палочки, в то время как клубкообразные молекулы с той же массой обладают значительно меньшей вязкостью (см. гл. 19). (Небольшое увеличение характеристической вязкости после резкого ее падения связано с увеличением степени ионизации: повышение плотности заряда приводит к выпрямлению цепи в клубке и соответственно к большему трению между полимером и растворителем.) Степень ионизации постоянно растет с увеличением pH, но до тех пор, пока не ионизируется приблизительно 40% карбоксильных групп, заметных изменений в конформации полимера не происходит. Степень ионизации 50% достигается примерно при pH 5,8, что превышает значение pK карбоксильных групп в воде. Отчасти это обусловлено присутствием диоксана, электростатическими эффектами, затрудняющими отщепление протона от цепи, которая несет отрицательные заряды, и тем преимуществом, которое имеют незаряженные остатки при встраивании в спираль.

Изменение оптического вращения и характеристической вязкости происходит настолько резко, что переход спираль — клубок относят к разряду кооперативных процессов, крайним случаем которых является процесс, проходящий по принципу «все или ничего». Отличительной чертой кооперативных процессов является то, что молекулы предпочитают находиться в полностью спиральном состоянии либо в состоянии статистического клубка и избегают промежуточных состояний. Проводя грубую аналогию с резкими изменениями физических свойств твердого тела при переходе его из одного состояния в другое (например, при плавлении), можно применить к исследуемому переходу термин «фазовый переход». Правда, плавление твердого тела — это скачкообразный процесс, тогда как переход спираль — клубок все-таки осуществляется постепенно.

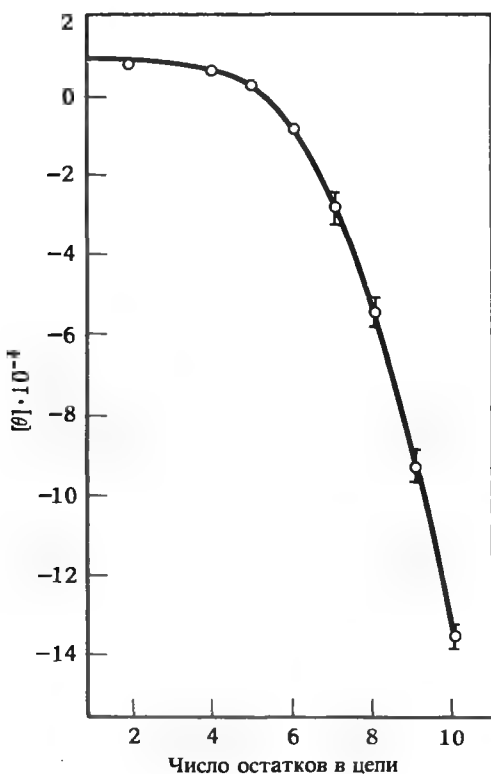


РИС. 20.6. Формирование спирали и длина цепи. Зависимость молярной эллиптичности при 222 нм от длины цепи (выраженной в числе остатков) для олигомеров N-карбобензоксиг-этил-L-глутаминовой кислоты. (Goodman M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **64**, 444, 1969.)

Переход спираль — клубок можно вызвать и небольшим изменением температуры. Кроме того, способность полимера к образованию спирали сильно зависит от длины цепи. На рис. 20.6 приведена зависимость молярной эллиптичности при 222 нм (см. гл. 8) от длины цепи n для олигомеров N-карбобензоксиг-этил-L-глутаминовой кислоты в трихлорэтаноле. Большая отрицательная эллиптичность этой полосы характерна для α -спиралей. Отметим, что до $n = 5$ эллиптичность остается малой по величине и не зависит от длины цепи. Начиная с $n = 6$ она очень круто падает и к $n = 10$ уменьшается во много раз, указывая на значительную α -спирализацию декамера. Как будет показано позже в этой главе, резкость перехода спираль — клубок (кажущаяся кооперативность) и температура полуперехода (температура, при которой степень спиральности равна 1/2) также зависят от длины цепи. Причины этого становятся очевидны из рассмотрения молекулярного механизма перехода и количественного анализа его равновесных свойств. С учетом всего этого легко объяснить данные, приведенные на рис. 20.6.

20.3. Молекулярный механизм перехода

Возникает естественный вопрос: каковы физические причины кооперативности перехода спираль — клубок? Другими словами — почему с таким трудом образуется зародыш спирали и почему процесс легко идет после того, как зародыш образовался? Для того чтобы ответить на этот вопрос, необходимо более детально рассмотреть структуру α -спирали и стабилизирующие ее силы.

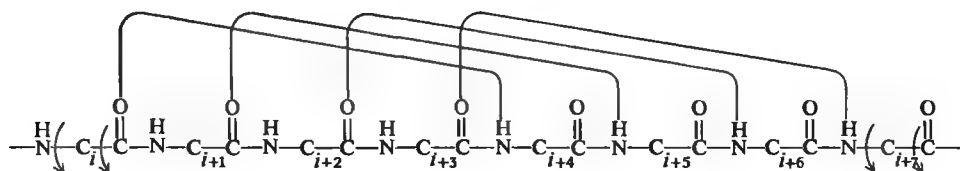


РИС. 20.7. Система водородных связей в α -спирали. На этом схематическом рисунке указаны двугранные углы вращения вокруг валентных связей, идущих к α -углеродным атомам C_i и C_{i+7} . Боковые группы для простоты не изображены.

На рис. 20.7 схематически изображена система водородных связей в α -спирали. Поскольку каждая такая связь идет от i -го к $(i+4)$ -му остатку, она охватывает шесть двугранных углов вращения. Рассмотрим трудности, возникающие на самом первом этапе формирования α -спирали из статистического клубка. Вначале аминокислотные остатки в цепи распределены по конформациям случайным образом, так что углы ϕ и ψ могут принимать множество разных значений (см. гл. 5). Предположим, что при каких-то условиях, например при понижении температуры, становится выгодным формирование водородных связей; образование первой связи все равно будет затруднено тем, что при этом шесть углов вращения должны быть фиксированы. Это приводит к значительной потере конформационной энтропии, которая может компенсироваться только за счет благоприятных взаимодействий, возникающих в результате образования одиночной водородной

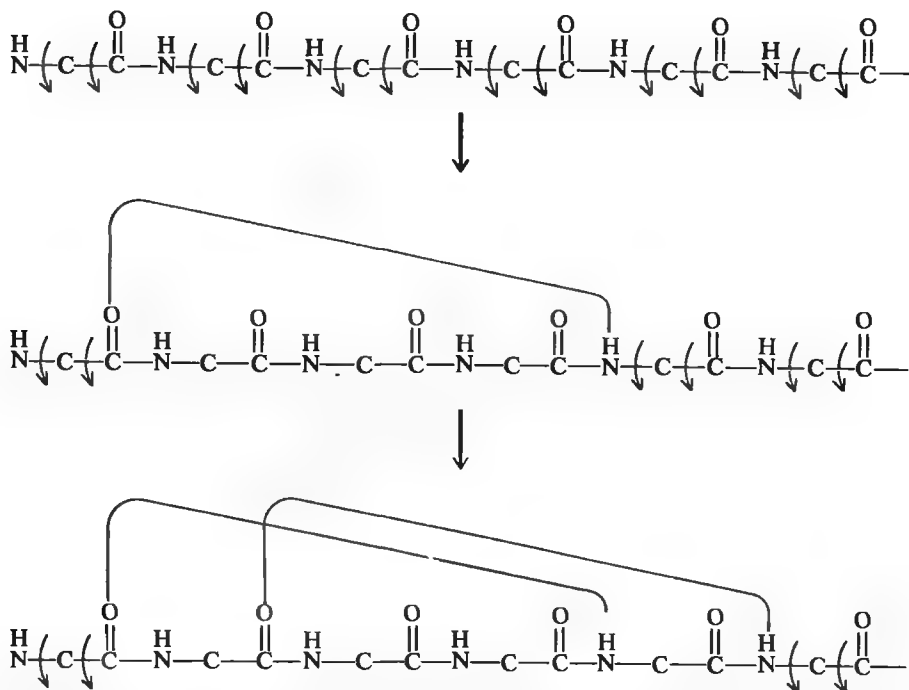


РИС. 20.8. Инициация процессов образования спирали. Видно, что при образовании первой водородной связи фиксируется шесть углов вращения, а при образовании следующей — только два.

связи. Однако образование второй и последующих водородных связей не сопряжено с преодолением столь высокого энтропийного барьера, если они формируются *по соседству* с первой. Это объясняется тем, что после образования первой связи для формирования соседних связей должны быть фиксированы только два угла вращения (одна пара ϕ , ψ) в расчете на одну водородную связь (рис. 20.8). Ясно, что водородные связи будут стремиться образовываться не поодиночке, а группами, чтобы компенсировать те невыгодные эффекты, которыми сопровождается образование связи-зародыша. Спирали не будут разбросаны короткими участками по всей полипептидной цепи, а образуют одну длинную последовательность. В результате переход в целом приобретает характер явления, происходящего по принципу «все или ничего».

Однако кооперативность имеет еще одну причину. Плотная, компактная структура спирали приводит к сильным диполь-дипольным взаимодействиям между амидными группами, разделенными несколькими остатками (обсуждение диполь-дипольных взаимодействий см. в гл. 5). Суммарная энергия диполь-дипольного взаимодействия в спирали может быть весьма существенной, а зависимость этой энергии от длины спирали оказывает значительное влияние на кооперативность.

В α -спирали диполи амидных групп ориентированы почти параллельно оси спирали (рис. 20.9), поэтому соседние диполи отталкиваются друг от друга, так как они расположены бок о бок. Однако диполи, расположенные через один и дальше, притягиваются, поскольку они занимают положение «голова к хвосту». Наиболее выгодным является взаимодействие данного диполя с третьим соседом. Оценки показывают, что в длинных

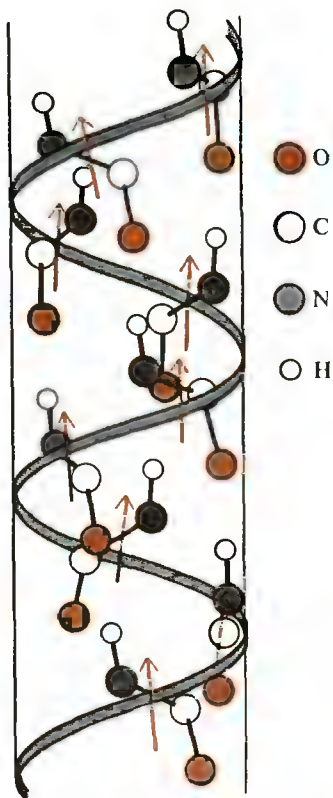


РИС. 20.9. Ориентация диполей амидных групп (указаны стрелками) в правой α -спирали. (Wada A. In: Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins, ed. M. A. Stahman, Madison, Univ. of Wisconsin Press, 1962, p. 131.)

α -спиралях суммарная энергия диполь-дипольного взаимодействия любого остатка со всеми последующими отрицательна и лежит в пределах от -1 до -2 ккал на моль остатков (Brant, 1968), т.е. вклад диполь-дипольных взаимодействий в суммарную энергию в длинных спиралях очень велик. Брант подсчитал, что энергия диполь-дипольных взаимодействий достигает насыщения, когда за данным остатком следуют примерно десять других «спиральных» остатков. Следовательно, остатки, расположенные близко к концам спирали, имеют дефицит энергии стабилизации. Итак, диполь-дипольные взаимодействия препятствуют образованию большого числа отдельных спиралей (структуры с большим числом концов) и способствуют формированию длинных спиральных участков. Это еще один важный фактор, обуславливающий кооперативность процесса формирования спирали.

20.4. Простое термодинамическое рассмотрение перехода

Простой термодинамический подход позволяет глубже понять принципы перехода спираль — клубок. Хотя предлагаемое рассмотрение чрезвычайно упрощено, некоторые качественные его аспекты весьма поучительны. Этот метод является модификацией метода, предложенного Шеллманом (John Schellman, 1955).

Предположим, что все цепи находятся в состояниях или полностью спиральном, или полностью неупорядоченном и что в одной цепи может существовать только один тип структуры. Это означает, что если степень спиральности θ равна $1/2$, то половина всех молекул — спирали, а половина — статистические клубки (это ограничение является весьма жестким). Изменение свободной энергии $\Delta G_{\text{ост}}$ при переходе остатка, находящегося в клубке, в состав спирального участка, равно

$$\Delta G_{\text{ост}} = \Delta H_{\text{ост}} - T \Delta S_{\text{ост}} \quad (20.1)$$

где $\Delta H_{\text{ост}}$ и $\Delta S_{\text{ост}}$ — изменения энтальпии и энтропии в расчете на остаток. Предполагается, что изменение энтальпии связано с формированием водородных связей, а изменение энтропии обусловлено большей конформационной свободой остатков в клубке (по сравнению со «спиральными» остатками). На самом деле растворитель тоже может оказывать влияние на данные параметры, но при простом рассмотрении эти эффекты не учитываются. Полное изменение свободной энергии для цепи из n остатков, однако, не равно просто $n \Delta G_{\text{ост}}$ — из-за концевых эффектов в такой спирали недостает четырех водородных связей (см. рис. 20.7). На аминоконце четыре N — H-донора не имеют партнеров, а на карбоксильном конце расположены четыре неспаренных C = O-акцептора. Кроме того, конформационная свобода (энтропия) концевых остатков не зависит от того, в каком состоянии — спиральном или клубкообразном — находится цепь. Основываясь на этих простых соображениях, можно представить полное изменение свободной энергии $\Delta G_{\text{полн}}$ в виде

$$\Delta G_{\text{полн}} = (n - 4) \Delta H_{\text{ост}} - (n - 2) T \Delta S_{\text{ост}} \quad (20.2)$$

Константа равновесия процесса равна

$$K = ck^n = (\text{Спираль})/(\text{Клубок}) \quad (20.3)$$

где

$$\ln k = -(\Delta H_{\text{ост}} - T \Delta S_{\text{ост}})/RT \quad (20.4)$$

$$\ln c = -(-4 \Delta H_{\text{ост}} + 2 T \Delta S_{\text{ост}})/RT \quad (20.5)$$

Из уравнения (20.3) следует, что при больших n малые изменения k (вызванные, например, изменением T) могут привести к резким изменениям константы равновесия K . Пара-

метр с учитывает нехватку водородных связей на концах цепи и конформационную свободу концевых остатков. [Отметим, что знаки множителей $\Delta H_{\text{ост}}$ и $\Delta S_{\text{ост}}$ в уравнениях (20.4) и (20.5) противоположны. Следовательно, изменения k при вариациях T будут частично компенсироваться за счет изменения c .]

Не составляет труда найти зависимость температуры полуперехода T_m от длины цепи n . При $T = T_m$ мы имеем $\Delta G_{\text{полн}} = 0$ и $K = 1$. Следовательно,

$$\Delta G_{\text{полн}} = 0 = (n - 4)\Delta H_{\text{ост}} - T_m(n - 2)\Delta S_{\text{ост}} \quad (20.6)$$

и

$$T_m = [(n - 4)/(n - 2)](\Delta H_{\text{ост}} / \Delta S_{\text{ост}}) \quad \text{для } n \geq 5 \quad (20.7)$$

Условие $n \geq 5$ необходимо потому, что для образования одной водородной связи требуется минимум пять остатков. Из уравнения (20.7) видно, что T_m существенно зависит от длины цепи. При $n = 5$ мы имеем $T_m = (1/3)\Delta H_{\text{ост}}/\Delta S_{\text{ост}}$; при больших n T_m асимптотически стремится к величине $T_m = \Delta H_{\text{ост}}/\Delta S_{\text{ост}}$. Согласно уравнению (20.7), изменение T_m при n больше примерно 30 должно быть незначительным. Теоретическая зависимость T_m от n качественно соответствует экспериментальным данным, но количественное согласие теории с экспериментом весьма плохое. На самом деле T_m меняется в значительно более широком диапазоне значений n , чем дает рассмотренная нами простая теория.

Найдем теперь зависимость резкости перехода от длины цепи. Этот параметр определяется как наклон кривой на графике зависимости θ от T при $\theta = 1/2$ или $T = T_m$. Таким образом, нам нужно получить выражение для $(d\theta/dT)_{T=T_m}$. Для этого продифференцируем выражение для константы равновесия, имея в виду, что θ — это доля остатков, находящихся в составе спиральных участков, а $1 - \theta$ — доля остатков в составе статистического клубка:

$$\ln K = \ln[\theta/(1 - \theta)] = \ln \theta - \ln(1 - \theta) \quad (20.8)$$

$$= -[(n - 4)\Delta H_{\text{ост}} - (n - 2)T\Delta S_{\text{ост}}]/RT \quad (20.9)$$

и

$$\frac{1}{\theta} \left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T=T_m} - \frac{1}{1 - \theta} \left(-\frac{d\theta}{dT} \right)_{T=T_m} = \left(\frac{d(\ln K)}{dT} \right)_{T=T_m} \quad (20.10)$$

Поскольку при $T = T_m$ $\theta = 1/2$ и, согласно соотношению Вант-Гоффа, $[d(\ln K)/dT]_{T=T_m} = \Delta H_{\text{полн}}/RT_m^2 = (n - 4)\Delta H_{\text{ост}}/RT_m^2$, то

$$4(d\theta/dT)_{T=T_m} = (n - 4)\Delta H_{\text{ост}}/RT_m^2 \quad (20.11)$$

или

$$(d\theta/dT)_{T=T_m} = (1/4)(n - 2)^2(\Delta S_{\text{ост}})^2/(n - 4)\Delta H_{\text{ост}} \quad (20.12)$$

Соотношение (20.12) было получено из (20.11) подстановкой выражения для T_m из (20.7). Из уравнения (20.12) следует, что крутизна кривой перехода будет увеличиваться с длиной цепи; это предсказание находится в качественном согласии с экспериментом. Такое увеличение крутизны обусловлено увеличением изменения энтальпии с ростом числа остатков. Однако уравнение (20.12) предсказывает также, что крутизна увеличивается неограниченно с ростом n , и это не согласуется с экспериментальными данными.

Неспособность столь простого термодинамического рассмотрения количественно объяснить экспериментальные результаты связана с тем, что предположение о существовании цепей или в полностью спиральной, или в полностью клубкообразной конформациях является слишком сильным. Хотя образование границы спираль — клубок термодинамически невыгодно (разд. 20.3), существует конечная вероятность того, что молекула будет содержать как спиральные, так и клубкообразные участки одновременно. Чем длиннее цепь, тем больше вероятность существования спиральных областей, разделенных клубкообразными участками. Для адекватного описания реальной ситуации следует использовать более строгий подход с привлечением аппарата статистической термодинамики. С этой целью могут быть применены две более точные теории. В первой из них предполагается, что спиральные и клубкообразные структуры могут существовать в одной цепи одновременно, но в каждой цепи образуется только один спиральный участок. Таким образом, спираль может начать формироваться в любой части цепи, но новые «спиральные» остатки появляются только на концах спирали. Эта модель типа «застежка-молния» хорошо описывает переход в коротких полипептидных цепях. В рамках второй, более точной теории считается, что в одной цепи может существовать любое число спиральных и клубкообразных областей.

Эти более адекватные модели требуют использования аппарата статистической термодинамики. Прежде чем перейти к их рассмотрению, познакомимся с методом построения статистических сумм.

20.5. Использование статистических сумм для анализа конформационного равновесия простых линейных цепей

Для более строгого анализа перехода спираль — клубок необходимо найти выражение для статистической суммы через статистические веса. Эта процедура весьма полезна при рассмотрении конформационного равновесия в полимерных молекулах. По существу такая статистическая сумма записывается через константы равновесия для элементарных процессов.

Статистическая сумма q для молекулы может быть представлена в виде

$$q = \sum_i g_i e^{-\varepsilon_i/kT} \quad (20.13)$$

где ε_i — энергия i -го энергетического уровня, а g_i — число состояний с энергией ε_i . Параметр g_i называется также *степенью вырождения* i -го уровня. Иногда система может перейти на данный энергетический уровень несколькими путями; это обстоятельство и учитывается с помощью степени вырождения. Например, различные комбинации колебательных, вращательных и электронных энергетических уровней могут привести к одной и той же полной энергии ε_i , и общее число таких комбинаций должно быть включено в степень вырождения g_i . Таким образом, статистическая сумма является суммой по всем микросостояниям молекулы с учетом бoльцмановских факторов для всех этих состояний.

Рассмотрим теперь гипотетическую полимерную молекулу из четырех элементов A , каждый из которых может находиться в одном из двух конформационных состояний: A_+ или A_- . (В своей классической работе Зимм и Брэгг использовали для обозначения двух состояний цифры 1 и 0; см. Zimm, Bragg, 1959.) Возможные конформационные состояния цепи могут быть следующими: $A_+A_-A_-A_+$, $A_-A_+A_+A_-$, $A_-A_-A_+A_+$ и т.д. Чтобы избежать необходимости учитывать симметричные варианты, мы предполагаем, что цепь имеет направление, так что конфигурация $A_+A_-A_-A_+$ отличается от конфигурации $A_-A_+A_+A_-$. Каждый элемент в состоянии A_- или A_+ имеет свой собственный набор

энергетических уровней и соответствующих степеней вырождения, но мы предполагаем, что детали колебательных, электронных и других состояний молекулы неизвестны. Однако даже в этом случае мы можем представить статистическую сумму, определяемую уравнением (20.13), в виде, который окажется весьма полезным.

Расчленим сумму в уравнении (20.13) следующим образом. Предположим, что все члены, отвечающие состоянию типа $A_-A_-A_-A_-$, вносят в статистическую сумму q коллективный вклад q_0 . Аналогичным образом предположим, что коллективный вклад членов, отвечающих состоянию $A_+A_-A_-A_-$, равен q_1 . Далее, для простоты будем считать, что все конформации, включающие i элементов A_+ , вносят в статистическую сумму одинаковый вклад q_i . Следовательно, поскольку существуют четыре состояния цепи с одним A_+ , их вклад равен $4q_1$. Разместить два элемента A_+ в цепи, состоящей из четырех элементов, можно шестью способами. Каждое состояние с двумя A_+ вносит вклад q_2 в статистическую сумму, таким образом, шесть подобных состояний вносят вклад, равный $6q_2$. Аналогично, четыре состояния с тремя элементами A_+ дают вклад $4q_3$, а одно состояние с четырьмя A_+ — вклад q_4 . Следовательно, статистическая сумма равна

$$q = q_0 + 4q_1 + 6q_2 + 4q_3 + q_4 \quad (20.14)$$

$$= q_0(1 + 4k_1 + 6k_2 + 4k_3 + k_4) \quad (20.15)$$

где $k_i = q_i/q_0$. Параметры k_i есть микроскопические константы равновесия для перехода молекулы из состояния со всеми элементами A_- в данное состояние. Например,

$$k_1 = (A_+A_-A_-A_-)/(A_-A_-A_-A_-) = (A_-A_+A_-A_-)/(A_-A_-A_-A_-) = \dots \quad (20.16)$$

$$k_2 = (A_+A_+A_-A_-)/(A_-A_-A_-A_-) = (A_+A_-A_+A_-)/(A_-A_-A_-A_-) = \dots \quad (20.17)$$

Эти соотношения прямо следуют из того факта, что доля молекул с числом i элементов A_+ равна q_i/q , а доля молекул типа $A_-A_-A_-A_-$ равна q_0/q . Отношение $(q_i/q)/(q_0/q) = q_i/q_0$ и дает константу равновесия k_i .

Таким образом, мы представили статистическую сумму в виде суммы констант равновесия [уравнение (20.15)]. Для большинства практических задач параметр q_0 несуществен, поскольку при расчетах он сокращается. Рассмотрим типичную задачу, состоящую в нахождении доли молекул с заданным числом элементов A_+ . Определим, например, долю θ_{2+} молекул, содержащих два элемента A_+ :

$$\theta_{2+} = 6q_2/q \quad (20.18)$$

$$= q_0(6k_2)/q_0(1 + 4k_1 + 6k_2 + 4k_3 + k_4) \quad (20.19)$$

$$= 6k_2/(1 + 4k_1 + 6k_2 + 4k_3 + k_4) \quad (20.20)$$

Как мы видим, параметр q_0 при расчетах сократился. Если мы примем за состояние, от которого ведется отсчет (эталонное состояние), молекулу, состоящую только из элементов A_- , то q_0 будет той частью статистической суммы, которая отвечает этому эталонному состоянию. Обычно вкладу эталонного состояния приписывают единичное значение, т.е. $q_0 = 1$. Подобное предположение не влияет на величины параметров k_i , поскольку эти параметры определены относительно эталонного состояния. Таким образом, $\Delta G_i = -RT \ln k_i$ есть изменение свободной энергии при переходе молекулы из эталонного состояния $A_-A_-A_-A_-$ в данное состояние, содержащее i элементов A_+ .

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ВЕСА

Для дальнейшего упрощения статистической суммы предположим, что изменение свободной энергии ΔG , которое сопровождается переходом некоторого элемента из состояния A_+ в состояние A_- , не зависит от локализации этого элемента в последовательности. Тогда

$$k_1 = \exp(-\Delta G/RT) = s \quad (20.21)$$

$$k_2 = \exp(-2\Delta G/RT) = s^2 \quad (20.22)$$

и так далее, где s есть так называемый *статистический вес* элемента в состоянии A_+ . При $q_0 = 1$ выражение (20.15) для статистической суммы приобретает вид

$$\begin{aligned} q &= 1 + 4s + 6s^2 + 4s^3 + s^4 \\ &= \sum_{i=0}^4 \Omega_i s^i \\ &= (1 + s)^4 \end{aligned} \quad (20.23)$$

где Ω_i есть число способов размещения i элементов A_+ в цепи из четырех элементов. Легко видеть, что $\Omega_i = 4!/(4-i)!i!$; это прямо следует¹ из биномиального разложения $(1 + s)^4$. Таким образом, статистическая сумма теперь представляется в виде суммы членов, содержащих разные степени единственного параметра — статистического веса s , отвечающего каждому элементу A_+ (каждому элементу A_- соответствует множитель единицы).

ПРАВИЛА ПОСТРОЕНИЯ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СУММЫ

Хотя рассмотренный выше пример чрезвычайно прост, общая схема построения статистической суммы путем представления ее в виде суммы констант равновесия или статистических весов остается в силе при решении многих задач, связанных с анализом конформаций полимерных молекул. Более сложные задачи могут потребовать включения большего числа статистических весов. Эти параметры в свою очередь (как мы увидим впоследствии) можно получить из экспериментальных данных. Ниже мы приводим основные этапы построения статистической суммы.

1. Рассматриваются все возможные конформации цепи.
2. Устанавливается эталонное состояние элемента цепи, которому приписывается статистический вес, равный единице.
3. Для каждой конформации цепи приписывается соответствующий статистический вес каждому элементу, не находящемуся в эталонном состоянии.
4. Строится статистическая сумма путем суммирования (по всем конформациям) произведений статистических весов, отвечающих каждой конформации.

¹ См. также уравнение (15.14) и текст к нему.

20.6. Модель типа «застежка-молния» для перехода спираль — клубок

В рамках этой модели предполагается, что каждый остаток в полимере существует в одном из двух возможных состояний: «спиральном» (h) или «неупорядоченном» (c), причем все «спиральные» остатки сосредоточены в одном месте, образуя непрерывный участок. Зародыш спиральной последовательности может образоваться в любой точке, от которой начинает распространяться по цепи сеть водородных связей. Таким образом, конформации ... cссhhhhhccсс ... и ... hhhhhccсссс ... считаются в этой модели разрешенными, тогда как конформации ... hhhhhhhccсссчhhhhhh ... и ... cссчhhhhccсчhhhhccсс ... — запрещенными.

В реальной α -спирали из m звеньев число остатков с координатами ϕ и ψ , соответствующими спиральной конформации, не превышает $m - 2$ (поскольку два крайних остатка достаточно свободны), а наибольшее число водородных связей равно $m - 4$ (см. разд. 20.4). Однако мы будем считать, что цепь состоит из n элементов, каждый из которых может находиться в составе или спирали, или клубка. Для интересующих нас случаев это упрощение не оказывает существенного влияния на результаты.

ВЫБОР СТАТИСТИЧЕСКИХ ВЕСОВ

Для нахождения статистической суммы нужно воспользоваться правилами, приведенными в разд. 20.5. Мы будем следовать здесь методу, изложенному Шеллманом (J. A. Schellman, 1958). Примем состояние остатка в составе клубка (c) за эталонное и, следовательно, припишем ему статистический вес, равный единице. Пусть s — константа равновесия (статистический вес) для процесса образования нового спирального остатка на конце спиральной последовательности:

$$s = \frac{(\cdots \text{cccchhhhhh}\underline{\text{cccc}} \cdots)}{(\cdots \text{ccccchhhhhh}\underline{\text{ccccc}} \cdots)} \quad (20.24)$$

(интересующий нас остаток подчеркнут). Этот статистический вес отвечает *акту роста* спирали. По причинам, изложенным выше, инициация спирали в точке цепи, находящейся в состоянии клубка, сильно затруднена по сравнению с ростом спирали. Введем константу равновесия *инициации* спиралей, или *акта образования зародыша (нуклеации)* σs , причем константа нуклеации $\sigma \ll 1$

$$\sigma s = \frac{(\cdots \text{cccch}\underline{\text{cccc}} \cdots)}{(\cdots \text{ccccccccc} \cdots)} \quad (20.25)$$

На самом деле для образования первой водородной связи должны быть упорядочены три остатка (разд. 20.3), но в настоящем рассмотрении мы этим пренебрегаем. Важным обстоятельством является то, что акт нуклеации спирали значительно менее выгоден, чем акт роста.

ПОСТРОЕНИЕ И РАСЧЕТ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СУММЫ

Теперь, учитывая все возможные конфигурации цепи и приписывая каждой из них соответствующий вес, легко найти статистическую сумму. Например, вклад конфигурации ... cссчhhhhccсс ... равен σs^5 , а конфигурации hhhccссс — σs^3 . Для цепи, состоящей из n элементов,

$$q = 1 + \sum_{k=1}^n \Omega_k \sigma s^k \quad (20.26)$$

где Ω_k есть число способов, которым можно образовать единую спиральную последовательность из k элементов в цепи из n звеньев. Этот параметр равен

$$\Omega_k = (n - k + 1) \quad (20.27)$$

(что легко показать методом индукции по k). Подставляя (20.27) в уравнение (20.26), мы можем прямо получить выражение для статистической суммы. Члены, которые нужно найти, имеют вид $\sum_k s^k$ и $\sum_k ks^k$, где суммирование производится по всем k от 1 до n .

Первая сумма есть не что иное, как сумма членов геометрической прогрессии:

$$\sum_{k=1}^n s^k = (s^{n+1} - s)/(s - 1) \quad (20.28)$$

Дифференцируя (20.28), получаем вторую сумму:

$$s \frac{d}{ds} \sum_{k=1}^n s^k = \sum_{k=1}^n ks^k \quad (20.29)$$

$$= [s/(s - 1)^2][ns^{n+1} - (n + 1)s^n + 1] \quad (20.30)$$

Подстановка этих результатов в уравнение (20.26) дает

$$q = 1 + [\sigma s^2/(s - 1)^2][s^n + ns^{n-1} - (n + 1)] \quad (20.31)$$

СТЕПЕНЬ СПИРАЛЬНОСТИ И ВЕРОЯТНОСТИ

Теперь из статистической суммы можно легко получить степень спиральности θ . Вероятность $p(k)$ того, что k звеньев цепи находятся в составе спирали, равна

$$p(k) = (n - k + 1)\sigma s^k/q \quad (20.32)$$

Числитель в уравнении (20.32) есть просто член статистической суммы, отвечающий всем типам конфигураций цепи, которые содержат k водородных связей. Используя это уравнение, легко получить выражение для θ :

$$\theta = \langle k \rangle/n = \left(\sum_{k=1}^n kp(k) \right) / n \quad (20.33)$$

$$= \left(\sum_{k=1}^n k(n - k + 1)\sigma s^k \right) / nq \quad (20.34)$$

$$= s(\partial q / \partial s) / nq \quad (20.35)$$

$$= (1/n)[\partial(\ln q) / \partial(\ln s)] \quad (20.36)$$

Уравнение (20.36) демонстрирует элегантность метода статистических сумм; оно показывает, что средняя характеристика конформации θ может быть получена простым дифференцированием статистической суммы.

Преимущество такого подхода именно в том и состоит, что можно найти равновесные характеристики, взяв соответствующие производные статистической суммы (см. Davidson, 1962). Указанное выше дифференцирование дает

$$\theta = \frac{\sigma s}{(s-1)^3} \left(\frac{ns^{n+2} - (n+2)s^{n+1} + (n+2)s - n}{n\{1 + [\sigma s/(s-1)^2][s^{n+1} + n - (n+1)s]\}} \right) \quad (20.37)$$

Можно показать, что при $s = 0$ $\theta = 0$, а при больших s θ стремится к единице. Переход спираль — клубок происходит при промежуточных значениях s . В соответствии с нашей моделью для длинных цепей точка полуперехода ($\theta = 0,5$) достигается при $s = 1$. Поскольку s является константой равновесия, ее можно легко варьировать, например, изме-

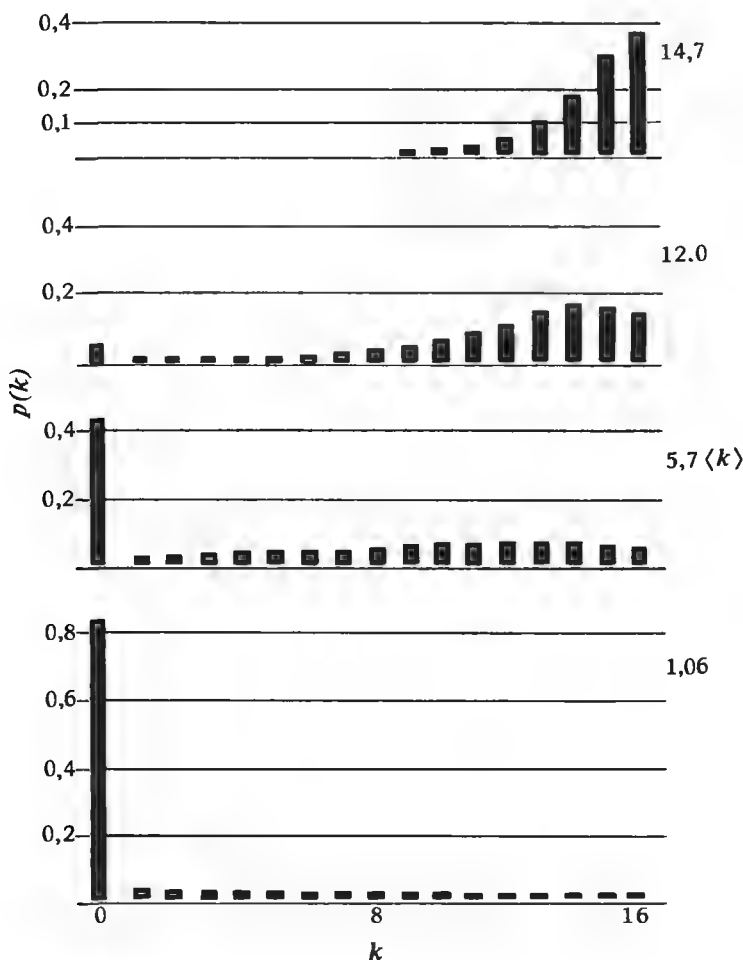


РИС. 20.10. Распределение спиральных участков по длинам при разных средних значениях k . (Schellman J. A., J. Phys. Chem., 62, 1485, 1958.)

нением температуры. Соотношения между константой равновесия s и наблюдаемыми экспериментальными параметрами обсуждаются в разд. 20.7.

С помощью уравнения (20.32) можно найти $p(k)$, распределение спиральных участков по длинам в процессе перехода спираль — клубок. На рис. 20.10 показаны примеры таких расчетов для цепи, состоящей из 16 остатков. Гистограммы приведены для случаев, когда $\langle k \rangle = 14,7; 12,0; 5,7$ и $1,1$ (или $\theta = 0,92; 0,75; 0,36; 0,07$ соответственно). В этих расчетах использовалось значение $\sigma = 1,5 \cdot 10^{-3}$. Из рисунка видно, что образуются только весьма длинные спиральные последовательности. Так, даже при $\theta = 0,36$ наибольшее значение $p(k)$, отличное от $p(k)$ при $k = 0$, достигается вблизи $k = 12$. Форма этих распределений определяется параметром σ . При малых σ (что означает более высокий барьер нуклеации) увеличивается неоднородность распределения, и образование протяженных полностью спиральных или клубкообразных участков становится еще более выгодным, чем формирование коротких спиральных последовательностей. Объясняется это тем, что, чем меньше σ , тем большей длины должна быть спиральная последовательность, чтобы компенсировать невыгодность нуклеации. Поэтому (для $s > 1$), чем меньше σ , тем большим должно быть k в произведении σs^k , чтобы получить достаточно большое значение $p(k)$ [см. уравнение (20.32)]. Таким образом, параметр σ «регулирует» кооперативность перехода (дальнейшее обсуждение этого вопроса можно найти в последующих разделах).

Этот простой термодинамический подход к рассмотрению перехода спираль — клубок оказывается весьма полезным и позволяет понять некоторые основные его особенности. Он является разумным приближением для случая коротких цепей, в которых образуется только одна спиральная область; в случае более длинных молекул могут формироваться два и даже больше спиральных участков, разделенных неупорядоченными областями, так что модель типа «застежка-молния» к ним неприменима. Здесь необходим более общий анализ с использованием матричных методов, который мы опишем ниже.

20.7. Матричный метод нахождения статистической суммы

Найдем статистическую сумму для общего случая, когда спиральные и неупорядоченные звенья могут находиться в любом месте цепи. Ограничение, состоящее в том, что спиральные остатки образуют единую последовательность, как в модели «застежка-молния», снимается. Снова представим себе цепь, составленную из n звеньев, каждое из которых может находиться в одном из двух состояний: h или s . Статистические веса $1, \sigma s$ и s приписываются тем же состояниям, что и раньше [см. уравнение (20.26)]. Если элементы h и s могут встречаться в любой комбинации, то статистическая сумма q равна

$$q = \sum_{j,k} \Omega_{j,k} \sigma^j s^k \quad (20.38)$$

где $\Omega_{j,k}$ есть число способов образования из k спиральных звеньев j разных спиральных последовательностей, разделенных одним или более неупорядоченными звеньями. Так, если $j = 3$ и $k = 50$, то 47 элементам h , следующим за другими h -элементами, приписывается множитель s^{k-3} , а трем h -звеньям, локализованным в самом начале трех спиральных последовательностей, — множитель $\sigma^3 s^3$. Вклад в статистическую сумму одного из этих состояний ($j = 3, k = 50$) равен, следовательно, $\sigma^3 k^{50}$. Однако каждая из этих трех спиралей может быть любой длины, от 1 до 48 h -звеньев, учитывая, что общее число элементов равно 50. Параметр $\Omega_{3,50}$ таким образом, дает число способов, которыми можно разместить 50 спиральных остатков в три различные последовательности.

НАХОЖДЕНИЕ МАТРИЦЫ СТАТИСТИЧЕСКИХ ВЕСОВ

Задача такого рода имеет давнюю историю. Она соответствует задаче об одномерной решетке Изинга, для которой статистическую сумму особенно легко рассчитать матричными методами, где каждому остатку цепи дается матричное представление. (Краткое введение в матричную алгебру можно найти в Приложении А.) Суть метода состоит в том, что приписываются статистические веса четырем возможным состояниям данного остатка относительно предшествующего, и затем из этих весов составляется матрица. Четыре состояния, для которых записываются статистические веса, есть c , следующий за s ; c , следующий за h ; h , следующий за s и, наконец, h , следующий за h . Соответствующие статистические веса равны 1 , 1 , σs и s [см. уравнения (20.24) и (20.25), а также предшествующее им обсуждение]. Матрица статистических весов имеет вид

$$\underline{M} = \begin{matrix} & \begin{matrix} c & h \end{matrix} \\ \begin{matrix} c \\ h \end{matrix} & \begin{pmatrix} 1 & \sigma s \\ 1 & s \end{pmatrix} \end{matrix} \quad (20.39)$$

Интерпретировать ее можно следующим образом. Элементы обозначаются m_{ij} , где i — номер строки, а j — номер столбца, в которых этот элемент расположен. Столбцы указывают состояние интересующего нас остатка (c или h), а строки — состояние его предшественника. Таким образом, элемент m_{12} есть σs , поскольку это статистический вес спирального остатка, который следует за неупорядоченным остатком.

РАСЧЕТ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СУММЫ С ПОМОЩЬЮ МАТРИЦЫ СТАТИСТИЧЕСКИХ ВЕСОВ

Статистическая сумма для цепи, состоящей из n остатков, может быть получена возведением матрицы $\underline{M}$ в n -ю степень. Этот процесс дает все возможные конфигурации цепи с соответствующими статистическими весами. Обоснованность этой процедуры определяется правилами перемножения матриц, при котором элементы матрицы $\underline{M}$ комбинируются именно таким образом, как это требуется.

Рассмотрим, например, цепь из двух остатков. Для нее возможны четыре конфигурации: cc , ch , hc , hh . Положим, что первому остатку «предшествует остаток» в состоянии c . Следовательно, согласно правилам построения статистической суммы, мы имеем четыре статистических веса: 1×1 , $1 \times \sigma s$, $\sigma s \times 1$ и $\sigma s \times s$, и статистическая сумма равна $q = 1 + 2\sigma s + \sigma s^2$. Эта сумма может быть также представлена в виде произведения матриц:

$$q = (1, 0) \underline{M} \underline{M} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (20.40)$$

$$= (1, \sigma s) \underline{M} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (20.41)$$

$$= (1 + \sigma s, \sigma s + \sigma s^2) \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (20.42)$$

$$= 1 + 2\sigma s + \sigma s^2 \quad (20.43)$$

Умножение вектор-строки $(1, 0)$ слева на первую матрицу $\underline{M}$ в уравнении (20.40) дает вектор-строку $(1, \sigma s)$ в уравнении (20.41), элементами которого являются два возможных

статистических веса для первого остатка в цепи. Поскольку этот остаток может быть только с, «следующий за с», или h, «следующий за с», его статистические веса равны 1 и α . Именно поэтому вектор-строка, являющийся левым множителем $\underline{\mathbf{M}}$ в уравнении (20.40), есть (1,0), а не (1,1). Вектор-строка в уравнении (20.42) состоит из элементов, равных статистическим весам всех четырех возможных конфигураций, а вектор-столбец позволяет их правильно просуммировать. Таким образом, статистическую сумму в этом простом случае легко получить, возведя в квадрат матрицу $\underline{\mathbf{M}}$ и используя затем соответствующие вектор-столбец и вектор-строку для получения скалярной суммы.

Обобщая, можно сказать, что для цепи из n остатков¹ статистическая сумма равна

$$q = (1, 0) \underline{\mathbf{M}}^n \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (20.44)$$

Для больших n процесс перемножения матриц становится очень трудоемким, и вычисления лучше производить с помощью компьютера. Однако эту операцию можно упростить. Матрицу $\underline{\mathbf{M}}$ можно привести к диагональному виду преобразованиями подобия. Это существенно упрощает расчет q , поскольку n -я степень диагональной матрицы есть просто матрица с диагональными элементами, равными диагональным элементам исходной матрицы, возведенным в n -ю степень.

ПРИВЕДЕНИЕ МАТРИЦЫ СТАТИСТИЧЕСКИХ ВЕСОВ К ДИАГОНАЛЬНОМУ ВИДУ

Пусть $\underline{\mathbf{T}}$ — матрица, преобразующая матрицу $\underline{\mathbf{M}}$ к диагональному виду, т.е.

$$\underline{\mathbf{T}}^{-1} \underline{\mathbf{M}} \underline{\mathbf{T}} = \underline{\mathbf{A}} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix} \quad (20.45)$$

где $\underline{\mathbf{T}}^{-1}$ — матрица, обратная $\underline{\mathbf{T}}$ (так что $\underline{\mathbf{T}} \underline{\mathbf{T}}^{-1} = \underline{\mathbf{I}}$ — единичная матрица), а λ_1 и λ_2 — собственные числа матрицы $\underline{\mathbf{M}}$ (см. Приложение А). Возвращаясь к уравнению (20.44), умножим каждый матричный сомножитель $\underline{\mathbf{M}}$ в произведении $\underline{\mathbf{M}}^n$ слева и справа на $\underline{\mathbf{T}} \underline{\mathbf{T}}^{-1}$. Статистическая сумма при этом не изменится, поскольку $\underline{\mathbf{T}} \underline{\mathbf{T}}^{-1} = \underline{\mathbf{I}}$, а умножение любой матрицы на единичную оставляет исходную матрицу без изменений. Таким образом,

$$q = (1, 0) (\underline{\mathbf{T}} \underline{\mathbf{T}}^{-1} \underline{\mathbf{M}} \underline{\mathbf{T}} \underline{\mathbf{T}}^{-1})^n \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (20.46)$$

$$= (1, 0) \underline{\mathbf{T}} \underline{\mathbf{A}}^n \underline{\mathbf{T}}^{-1} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (20.47)$$

Матрица $\underline{\mathbf{A}}^n$ равна

$$\underline{\mathbf{A}}^n = \begin{pmatrix} \lambda_1^n & 0 \\ 0 & \lambda_2^n \end{pmatrix} \quad (20.48)$$

¹ Напомним, что в рамках нашего упрощенного рассмотрения каждый из n остатков может находиться в состоянии или с, или h. Это объясняет наличие множителя $\underline{\mathbf{M}}^n$ в уравнении (20.44). Дэвидсон (N. Davidson, 1962) использует множитель $\underline{\mathbf{M}}^n - 1$, так как он считает, что первый остаток всегда находится в состоянии с. Это различие в данном случае несущественно.

Следовательно, путем приведения матрицы к диагональному виду можно значительно упростить вычисление статистической суммы. Единственная операция, которую необходимо выполнить, — это нахождение собственных чисел матрицы $\mathbf{M}$ и построение матриц $\mathbf{T}$ и $\mathbf{T}^{-1}$ по соответствующим собственным векторам.

Чтобы найти собственные числа матрицы $\mathbf{M}$, приравняем нулю детерминант:

$$0 = \begin{vmatrix} 1 - \lambda & \sigma s \\ 1 & s - \lambda \end{vmatrix} \quad (20.49)$$

$$= (1 - \lambda)(s - \lambda) - \sigma s \quad (20.50)$$

$$= \lambda^2 - (1 + s)\lambda + s(1 - \sigma) \quad (20.51)$$

Два корня уравнения (20.51) равны

$$\lambda_{1,2} = \{(1 + s) \pm [(1 - s)^2 + 4\sigma s]^{1/2}\}/2 \quad (20.52)$$

причем λ_1 соответствует положительный, а λ_2 — отрицательный знаки. Матрица преобразования $\mathbf{T}$ равна

$$\mathbf{T} = \begin{pmatrix} 1 - \lambda_2 & 1 - \lambda_1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \quad (20.53)$$

а обратная ей

$$\mathbf{T}^{-1} = \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \begin{pmatrix} 1 & \lambda_1 - 1 \\ -1 & 1 - \lambda_2 \end{pmatrix} \quad (20.54)$$

(Нахождение матриц $\mathbf{T}$ и $\mathbf{T}^{-1}$ рассмотрено в Приложении А.) Подставляя выражения для $\mathbf{T}$ и $\mathbf{T}^{-1}$ в (20.47), получим

$$q = [\lambda_1^{n+1}(1 - \lambda_2) - \lambda_2^{n+1}(1 - \lambda_1)]/(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (20.55)$$

Поскольку $\lambda_1 > \lambda_2$, для больших n имеем $\lambda_1^{n+1} \gg \lambda_2^{n+1}$. При этих условиях

$$q \cong \lambda_1^{n+1}(1 - \lambda_2)/(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (20.56)$$

$$\ln q \cong n \ln \lambda_1 \quad (20.57)$$

причем ошибка аппроксимации с помощью уравнения (20.57) с ростом n становится бесконечно малой.

РАСЧЕТЫ ПАРАМЕТРОВ С ПОМОЩЬЮ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СУММЫ

Среднее число $\langle k \rangle$ спиральных остатков и степень спиральности θ легко найти, пролифференцировав $\ln q$, который определяется уравнением (20.57) [ср. с уравнением (20.36)]:

$$\langle k \rangle = \partial(\ln q)/\partial(\ln s) = n \partial(\ln \lambda_1)/\partial(\ln s) \quad (20.58)$$

$$\theta = \langle k \rangle / n$$

$$= (s/\lambda_1)(1/2)\{1 + [(s-1) + 2\sigma]/[(1-s)^2 + 4\sigma s]^{1/2}\} \quad (20.59)$$

Соотношение (20.59) получено подстановкой выражения для λ_1 из (20.52) в (20.58). Параметры перехода легко найти с помощью формулы (20.59) и выражения для λ_1 (уравнение 20.52). Предположим, что $\sigma \ll 1$. Тогда s близко к единице, но все же немного меньше ее, так что $(1-s)^2 > 4\sigma s$. При этом выражение в фигурных скобках (20.59) становится близким к нулю и $\theta \cong 0$. [Отметим, что если s близко к единице, то $4\sigma s \cong 4\sigma$, и условие $(1-s)^2 > 4\sigma s$ означает, что $(1-s) > 2\sigma^{1/2} \gg 2\sigma$ (для $\sigma \ll 1$). Следовательно, $|s-1| \gg 2\sigma$, отношение в фигурных скобках в (20.59) становится примерно равным -1 , а все выражение в скобках -0 .] Эти условия означают, что должно выполняться неравенство $s < (1 - 2\sigma^{1/2})$. Когда s близко к единице, но немного больше ее, и $(1-s)^2 > 4\sigma s$, то $\lambda_1 \cong 1$ [из уравнения (20.52)] и $\theta \cong 1$ [из (20.59)]. [Заметим, что при $s > 1$ требование, чтобы $(1-s)^2$ было больше $4\sigma s$, означает, что $(s-1) > 2\sigma^{1/2} \gg 2\sigma$. Следовательно, при $(s-1) \gg 2\sigma$ отношение в фигурных скобках в (20.59) становится примерно равным единице, а все выражение в скобках — двум.] Эти условия требуют, чтобы выполнялось неравенство $s > (1 + 2\sigma^{1/2})$. Следовательно, переход происходит в очень узкой области значений s , примерно от $s = 1 - 2\sigma^{1/2}$ до $s = 1 + 2\sigma^{1/2}$. Ширина этой области определяется величиной $\sigma^{1/2}$. Рис. 20.11 иллюстрирует зависимость крутизны кривой перехода от σ : на нем представлены графики зависимости θ от s (в логарифмическом масштабе) для $\sigma = 10^{-2}$, 10^{-3} и 10^{-4} .

Интересно также отметить, что при $\sigma = 1$ (20.59) упрощается до

$$\theta = s/(1+s)$$

Это уравнение описывает некооперативный переход, при котором каждый остаток ведет себя независимо от других. На рис. 20.11 представлен также и этот случай. При $\sigma > 1$ цепь ведет себя антикооперативным образом. В этом случае зависимость θ от $\ln s$ с ростом $\ln s$ становится все менее крутой. Переход спираль — клубок — это кооперативный процесс; антикооперативные системы рассмотрены в гл. 17.

Другой представляющий интерес параметр — это среднее число спиральных областей $\langle j \rangle$. Из общего выражения для статистической суммы (20.38) прямо следует, что среднее

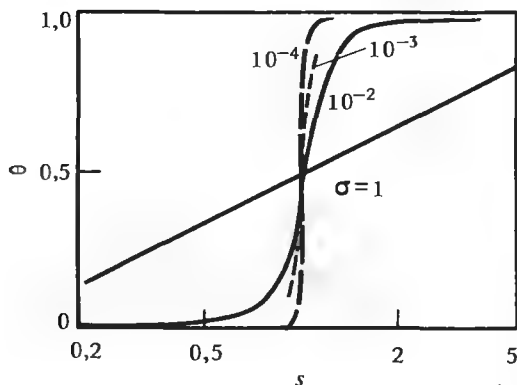


РИС. 20.11. Теоретические кривые зависимости степени спиральности θ от s (в логарифмическом масштабе) при разных σ . (Zimm B. H., Bragg J. K., J. Chem. Phys., 31, 526, 1959.)

значение j можно найти простым дифференцированием. Начнем с определения $\langle j \rangle$:

$$\langle j \rangle = \left(\sum_{k=1}^n \sum_{j=1}^k j \Omega_{j,k} \sigma^j s^k \right) / q \quad (20.60)$$

$$= (\sigma/q) (\partial q / \partial \sigma) \quad (20.61)$$

$$= \partial (\ln q) / \partial (\ln \sigma) \quad (20.62)$$

$$= n \partial (\ln \lambda_1) / \partial (\ln \sigma) \quad (20.63)$$

где вместо $\ln q$ мы подставили его выражение (20.57). После подстановки (20.52) в (20.63) и дифференцирования получим

$$\langle j \rangle = n \sigma s / \lambda_1 [(1-s)^2 + 4\sigma s]^{1/2} \quad (20.64)$$

Величина $\langle j \rangle$ достигает максимума в точке полуперехода ($s = 1$), где

$$\langle j \rangle = (n/2) \sigma^{1/2} \quad (20.65)$$

Обычно $\sigma = 10^{-4}$, так что в этой точке $\langle j \rangle = n/200$, т.е. одна спиральная область приходится в среднем на каждые 200 остатков. Поскольку в точке полуперехода $\langle k \rangle = n/2$, отношение $\langle k \rangle / \langle j \rangle$, определяющее среднюю длину спирального участка в этой точке, равно $\sigma^{-1/2}$. При $\sigma = 10^{-4}$ средняя длина спирального участка составляет 100 остатков. Таким образом, в точке полуперехода при $\sigma = 10^{-4}$ молекула в среднем состоит из спиральных участков длиной в 100 остатков, разделенных неупорядоченными участками такой же длины. Отметим, что средняя длина спиральных участков ($\sigma^{-1/2}$) не зависит от n для больших n [условие, при котором были выведены уравнение (20.55) и все последующие], т.е. спиральные участки не могут неограниченно расти, а достигают определенной конечной длины. Это связано с тем, что для длинных цепей выигрыш в энтропии, связанный с образованием более чем одного спирального участка, компенсирует затраты, связанные с нуклеацией. Уже давно установлено, что в одномерных системах, таких, как линейные полипептиды, истинный скачкообразный фазовый переход происходить не может.

20.8. Описание перехода спираль — клубок

Интересный подход к описанию перехода спираль — клубок для цепей разной длины и разных s состоит в построении соответствующих диаграмм в плоскости $n - s$ (рис. 20.12). Эти диаграммы основаны на анализе, сходном с тем, который был проведен в разд. 20.7, но несколько более точном. Переход происходит в основном в области, ограниченной значениями θ 0,1 и 0,9; эта область выделена на рисунке серым цветом. По обе стороны от нее находятся области, отвечающие в основном либо полностью спиральным, либо полностью неупорядоченным состояниям. Кривая, идущая диагонально через спиральную область, указывает условия, при которых половина цепей содержит только один спиральный участок. Наиболее очевидной особенностью перехода является то, что по мере уменьшения n он происходит при все более высоких значениях s . Это объясняется тем, что при малых n спиральные участки (в отличие от ситуации в длинных цепях) слишком коротки, чтобы могли компенсироваться неблагоприятные эффекты нуклеации, если s недостаточно велико.

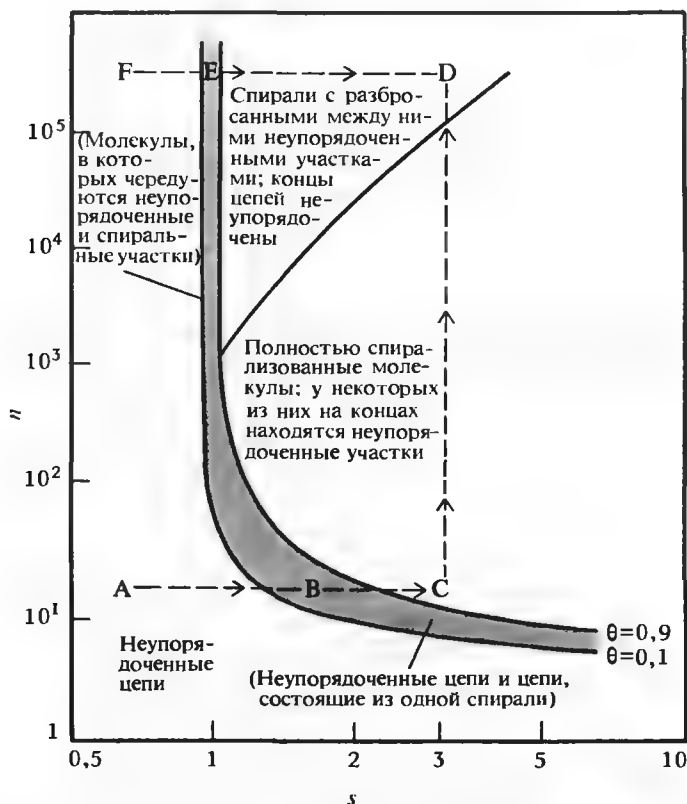


РИС. 20.12. Плоскость $n - s$ при $\sigma = 10^{-4}$. В качестве границ перехода произвольно выбраны кривые с $\theta = 0,9$ и $0,1$. Точки, лежащие на сплошной кривой, идущей по диагонали, соответствуют ситуации, когда половина цепей содержит только один непрерывный спиральный участок. (Zimm В. Н., Bragg J. К., J. Chem. Phys., **31**, 526, 1959.)

Из диаграммы видно также, что область значений s , при которых происходит переход, значительно шире для малых n , чем для больших, т.е. в случае длинных цепей переход более резкий. Это связано с тем, что зависимость полной константы равновесия (например, константы α^n для перехода между полностью неупорядоченным и полностью спиральным состояниями) от s с ростом n становится более сильной (ср. с нашим рассмотрением простой модели двух состояний в разд. 20.4). При больших n в статистической сумме основная часть слагаемых типа α^k отвечает большим k ($k < n$). Все эти слагаемые также очень сильно зависят от s вблизи $s = 1$. В результате статистическая сумма в целом сильнее зависит от s при больших n .

Рассмотрим теперь, как происходит переход $A \rightarrow B \rightarrow C$ при малых n . При перемещении от A к B имеет место переход от неупорядоченных молекул к смеси неупорядоченных же молекул и молекул, содержащих один спиральный участок. Вблизи точки C молекулы почти полностью спирализованы, и только у некоторых из них концы неупорядочены. При прохождении через спиральную область от C к D (увеличение n) начинают встречаться неупорядоченные участки, разбросанные между спиральными областями, преобладающими при этих условиях. При переходе от полностью спирального состояния к полнос-

тью неупорядоченному при больших n (вдоль линии $D \rightarrow E \rightarrow F$) мы попадем в область перехода, в которой спиральные и неупорядоченные участки чередуются. Таким образом, микроскопические состояния молекул, реализующиеся в области перехода, существенно меняются с изменением n .

Анализ, проведенный в разд. 20.7, неточен в одном отношении. На самом деле образование спирали начинается с упорядочивания одновременно трех остатков — только в этом случае может образоваться первая водородная связь. Мы игнорировали этот факт, но его можно учесть, увеличив ранг матрицы M . Однако для больших n рассмотренная нами приближенная модель достаточно точна, а вблизи $\theta = 1/2$ точность ее еще выше. Следовательно, во многих практических ситуациях рассматривать матрицы высокого ранга нет необходимости.

20.9. Сравнение с экспериментальными данными

Насколько хорошо рассмотренная нами в общих чертах теория описывает экспериментальные данные? Чтобы сравнить теорию с экспериментом, необходимо установить связь между параметрами σ и s , с одной стороны, и используемыми на опыте переменными — с другой. Предположим, что для константы равновесия s справедливо соотношение Вант-Гоффа

$$d(\ln s)/dT = \Delta H_g/RT^2 \quad (20.66)$$

где ΔH_g — изменение энтальпии при увеличении длины спирального участка на один остаток. Проинтегрировав это уравнение от T_m до T , получим

$$\ln s = (\Delta H_g/R)[(T - T_m)/TT_m] \quad (20.67)$$

где T_m — температура полуперехода. Таким образом, уравнение (20.67) связывает s и температуру, если известно ΔH_g . Параметр σ мы приняли равным константе. Это достаточно разумное приближение, поскольку есть основания считать, что σ в основном зависит от конформационных факторов, связанных с трудностями нуклеации. Значение σ выбирается так, чтобы получить наилучшее согласие теории с экспериментом. На самом деле необходимо подобрать и значение ΔH_g , так как оно обычно неизвестно.

На рис. 20.13 приведены экспериментальные данные и теоретические кривые перехода для поли- γ -бензил-L-глутаминовой кислоты со средней длиной цепи 1500, 46 и 26 остат-

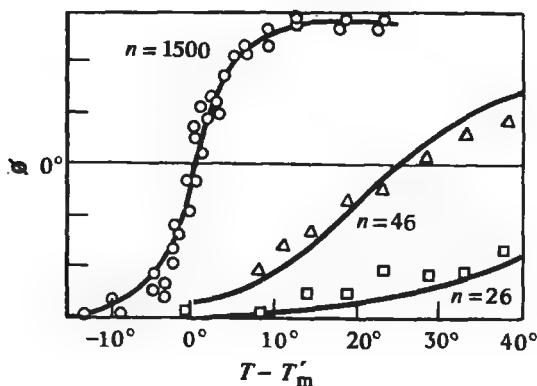


РИС. 20.13. Сравнение теоретических кривых и экспериментальных данных. Кривые — изменение оптического вращения, рассчитанного по предсказанной степени спиральности, в зависимости от $T - T'_m$ для поли- γ -бензил-L-глутаминовой кислоты при трех разных значениях длины цепи. Точки — экспериментальные данные. (Zimm B. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45, 1601, 1959.)

ков. По оси ординат отложена величина $T - T'_m$, где T'_m — температура полуперехода для образца с самой большой молекулярной массой. При расчетах σ и ΔH_g принимались равными соответственно $2 \cdot 10^{-4}$ и $890 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1}$. (Отметим, что в растворителе, в котором проводились измерения, — 80%-ная дихлоруксусная кислота, 20%-ный дихлорэтилен — формирование спиралей происходит при *увеличении* температуры. Это обусловлено тем, что дихлоруксусная кислота образует водородные связи с амидными группами остатков, находящихся в неупорядоченном состоянии. Следовательно, формирование спиралей является эндотермическим процессом, так как оно требует разрыва водородных связей с растворителем. Процесс характеризуется также положительным изменением энтропии, поскольку происходит освобождение ранее связанных молекул растворителя.) Согласие между теорией и экспериментом очень хорошее. В частности, предсказываемая теорией зависимость температуры полуперехода T_m и крутизны кривой перехода от n полностью подтверждается результатами экспериментов. Таким образом, теория дает адекватное описание перехода.

20.10. Параметры, характеризующие способность аминокислот встраиваться в спираль

Большой интерес представляет следующий вопрос: одинаковы ли аминокислоты по своей способности к образованию спиралей или из одних аминокислот спиральные структуры образуются легче, чем из других? Разумно предположить, что если определенные аминокислоты имеют тенденцию образовывать α -спираль, то именно они встречаются в спиральных участках глобулярных белков. Проверка этой гипотезы очень важна для понимания того, как из определенных аминокислотных последовательностей формируются специфические нативные конформации.

Большую работу в этой области проделали Г. Шерага и его сотрудники. Они предположили, что основную роль в определении того, обладает ли остаток спиральобразующей способностью, играют ближние взаимодействия. Под ближними понимают взаимодействия данного остатка с участками остова цепи, расположенными в непосредственной близости к этому остатку. Согласно расчетам, для разных аминокислот эти взаимодействия различны. Остаток глицина, например, обладает значительной конформационной свободой в полипептидной цепи (см. диаграмму для глицина на рис. 5.7). Поскольку в α -спиральной конформации ($\phi \cong -50^\circ$, $\psi \cong -50^\circ$) у глицина нет энергетически выгодных взаимодействий, из-за энтропийных факторов конформация статистического клубка для него является более предпочтительной. Если, однако, к α -углеродному атому присоединяется CH_3 -группа (в результате чего образуется остаток аланина), из-за невалентных взаимодействий α -спиральное состояние становится предпочтительнее. С другой стороны, для аспарагина взаимодействия полярной боковой группы с диполем амидной группы приводят к дестабилизации α -спиральной конформации этой аминокислоты. Чтобы оценить относительную склонность различных остатков принимать спиральную конформацию в полипептидной цепи, были выполнены расчеты для всех 20 встречающихся в природе аминокислот.

Основной вопрос, конечно, состоит в том, можно ли эти выводы проверить экспериментально. Изучать переход спираль — клубок в водной среде для многих гомополипептидов невозможно, так как они нерастворимы в воде. Однако спиральобразующую способность остатков можно исследовать методом «хозяин — гость». Он основан на анализе результата включения интересующей нас аминокислоты (гостя) в растворимый в воде гомополимер (хозяин), для которого переход спираль — клубок хорошо изучен. Из этих данных после соответствующего теоретического анализа можно оценить параметры σ и s для данного остатка.

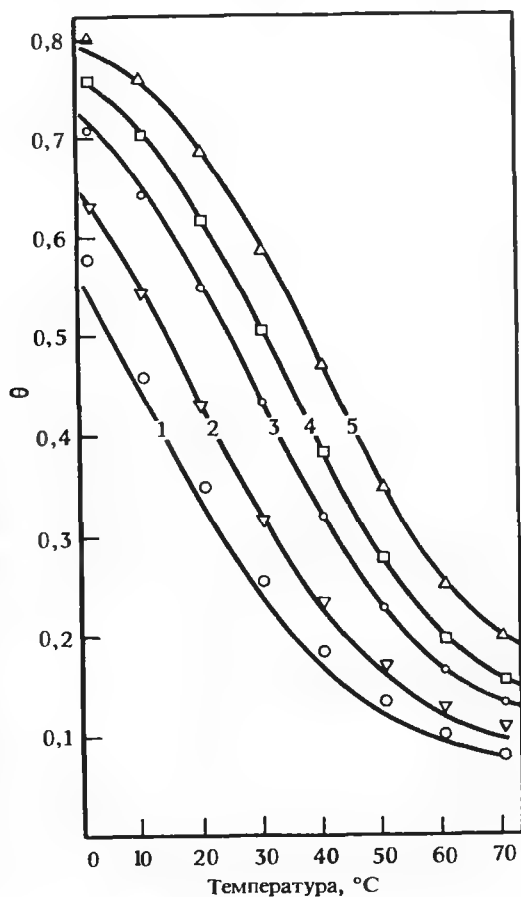


РИС. 20.14. Данные, полученные в экспериментах типа «хозяин — гость». Приведены зависимости степени спиральности от температуры для различных случайных сополимеров полигидроксипропилглутамин (хозяин) и L-аланина (гость). Кривые получены расчетным путем, точки соответствуют экспериментальным данным. Из-за неточности определения степени полимеризации и состава цепи расчетные кривые могут оказаться не вполне точными. На рисунке представлены данные для следующих значений длины цепи (степени полимеризации) и ее состава (содержание аланина): кривая 1 — 422, 14%; кривая 2 — 880, 21%; кривая 3 — 1010, 32%; кривая 4 — 1413, 38%; кривая 5 — 1102, 49%. (Platzer K. E. B. et al., *Macromolecules*, 5, 177, 1972.)

Этот подход иллюстрирует рис. 20.14. На рисунке приведена зависимость степени спиральности для случайных сополимеров полигидроксипропилглутамин (водорастворимый хозяин) и L-аланина (гость) от температуры. Согласно теории, включение остатка L-аланина в цепь хозяина должно привести к увеличению T_m . Экспериментальные данные, приведенные на рис. 20.14, подтверждают этот вывод. Видно, что теоретические кривые очень хорошо согласуются с экспериментальными данными. Интересно, что параметры σ и s , вычисленные из этих данных для остатка L-аланила, близки к таковым для того же остатка в блочных сополимерах L-аланина и D,L-лизина в водном растворе.

В табл. 20.1 приведены значения σ и s , полученные при 30°C для глицила, L-аланила, L-серила и L-лейцила методом «хозяин — гость». Согласно этим данным, глицин обладает наименьшей способностью (среди всех других приведенных остатков) инициировать образование спирали. В соответствии с теорией, наибольшей спиральобразующей способностью обладает L-лейцин. Была проведена оценка и для других остатков. Эти результаты затем использовались для анализа структуры белков. Например, результаты определения аминокислотной последовательности большого числа цитохромов с показали, что замена аминокислот в этих белках обычно происходит таким образом, чтобы сохранился спиральобразующий или спиральразрушающий характер остатка, расположенного в дан-

Таблица 20.1

ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ σ И s , ПОЛУЧЕННЫЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ
«ХОЗЯИН — ГОСТЬ» ПРИ 30°C¹⁾

	σ	s
Глицин	$1 \cdot 10^{-5}$	0,62
L-аланин	$8 \cdot 10^{-4}$	1,06
L-серин	$7,5 \cdot 10^{-5}$	0,79
L-лейцин	$33 \cdot 10^{-4}$	1,14

¹⁾ Scheraga H. A., Pure and Applied Chemistry, 36, 1, 1973.

иом месте цепи. Более того, спиральные участки кристаллических структур двух цитохромов с оказались состоящими преимущественно из остатков, имеющих наибольшую вероятность встраивания в спираль. Если подобные наблюдения окажутся справедливыми и в других случаях, можно будет предсказывать структуру белка, основываясь на данных о его аминокислотной последовательности и близких взаимодействиях. (Обсуждение подхода к предсказанию структуры белков можно найти в гл. 5.)

Краткие выводы

Конформационные переходы в белках и полипептидах имеют большое биологическое значение. Наиболее полно изученное конформационное изменение — это переход α -спираль — клубок в полипептидах; его анализ весьма полезен для понимания конформационного равновесия в других системах. Переход спираль — клубок может быть вызван изменением температуры или состава растворителя. В случае высокомолекулярных полипептидов он происходит в узком диапазоне значений этих параметров, т.е. является кооперативным процессом. Кооперативность можно качественно объяснить стерическими, энергетическими и статистическими ограничениями в α -спиральных и клубкообразных конформациях, которые способствуют росту уже существующих спиралей, а не образованию новых, рассеянных по всей цепи спиральных участков.

Чтобы количественно обосновать термодинамические свойства перехода, можно использовать несколько теоретических подходов. В модели типа «застежка-молния» предполагается, что в частично спирализованных молекулах имеется один спиральный участок (молекула может быть представлена в виде неполностью закрытой застежки-молнии). Эту модель отличает простота математического анализа; она дает правильные предсказания для коротких цепей. Более точное описание, учитывающее все возможные распределения спиральных и неупорядоченных участков в цепи, основано на применении матричных методов. Для этого подхода характерна краткая, но четкая формулировка задачи и ясное изложение ее ключевых моментов. Выводы, полученные в результате применения матричного анализа, находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными.

В матричном подходе характеристики перехода определяются константой нуклеации σ и параметром роста спирали s . В частности, σ определяет крутизну кривой перехода и среднюю длину спиральных участков в частично спирализованной молекуле, а s аналогична температуре. В рамках гипотезы о том, что способность к образованию спиралей у разных аминокислот может быть неодинаковой, была проведена оценка этих параметров

для различных остатков, входящих в состав полипептидов. Обнаруженное различие в склонности образовывать спираль позволило предположить, что спиральные участки в белках формируются из остатков с наибольшей спиральобразующей способностью. Если подобная корреляция получит дальнейшее подтверждение, это стимулирует исследования по предсказанию локализации спиральных участков в белковых молекулах исходя из их аминокислотной последовательности.

Задачи

20.1. Используя модель типа «застежка-молния», рассчитайте макроскопическую константу равновесия следующих переходов для цепи, состоящей из 100 остатков (каждый из которых может находиться в спиральном или неупорядоченном состоянии):

$$50\% \text{ спираль} \rightleftharpoons 20\% \text{ спираль } K_1 = (20\% \text{ спираль}) / (50\% \text{ спираль})$$

$$75\% \text{ спираль} \rightleftharpoons 25\% \text{ спираль } K_2 = (25\% \text{ спираль}) / (75\% \text{ спираль})$$

Примите при расчетах, что $s = 1$, $\sigma = 10^{-4}$.

20.2. Предположим, что полимерная молекула может существовать в трех состояниях: спираль 1, спираль 2 и статистический клубок. Переходы спираль 1 $\rightleftharpoons$ клубок и спираль 2 $\rightleftharpoons$ клубок высоко кооперативны и могут быть описаны в рамках модели типа «застежка-молния». Пусть статистические веса, соответствующие переходу спираль 1 $\rightleftharpoons$ клубок, равны σ и s , а переходу спираль 2 $\rightleftharpoons$ клубок — σ' и s' . Найдите величину σ' , если известно, что разность свободной энергии между состояниями спираль 1 и спираль 2 равна нулю, $s'/s = 10^{-0,02}$ и $\sigma = 10^{-4}$. Считайте, что цепь состоит из 100 остатков, каждый из которых может находиться или в спиральном, или в неупорядоченном состоянии.

20.3. Матрицы $\underline{T}$ и $\underline{T}^{-1}$ задаются формулами (20.53) и (20.54). Используя соотношение (20.47), проверьте правильность выражения для q (20.55).

20.4. Выведите соотношения (20.59) и (20.64), выполнив соответствующее дифференцирование.

20.5. Предположим, что имеется линейный полипептидный сополимер из остатков двух типов А и В, расположенных поочередно: АВ АВ АВ ... АВ. Запишите выражение для статистической суммы, используя следующие правила для остатков типа А: а) остатку, находящемуся в составе клубкообразного участка, соответствует статистический вес 1; б) спиральному остатку, следующему за неспиральным, соответствует статистический вес $\sigma_A s_A$; в) спиральному остатку, следующему за спиральным же, соответствует статистический вес s_A . К остаткам типа В применимы те же правила, только вместо параметров σ_A и s_A следует использовать соответственно σ_B и s_B . Цепь состоит из n остатков, причем из них $n/2$ — это остатки типа А, $n/2$ — типа В. Можно ли представить статистическую сумму q в виде

$$q = (1, 0) \underline{Q}^x \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

где $\underline{Q}$ — матрица 2×2 , а x — целое? Если да, то запишите все четыре элемента матрицы $\underline{Q}$ и x . Если нет, то объясните, почему статистическая сумма не может быть представлена в такой форме.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Bovey F. A.*, 1969. *Polymer Conformation and Configuration*, New York, Academic Press. [В гл. 4 описаны исследования α -спиралей и перехода спираль-клубок оптическими методами и с помощью ЯМР.]
- Davidson N.*, 1962. *Statistical Mechanics*, New York, McGraw-Hill. [Хороший вводный курс. В гл. 16 рассмотрен переход порядок — беспорядок и описаны матричные методы.]
- Flory P. J., Miller W. G.*, 1966. A general treatment of helix—coil equilibria in macromolecular systems, *J. Mol. Biol.*, **15**, 284.
- Poland D., Scheraga H. A.*, 1970. *Theory of Helix—Coil Transitions in Biopolymers*, New York, Academic Press. [Всестороннее обсуждение вопроса; содержит много ссылок.]
- Schellman J. A.*, 1958. The factors affecting the stability of hydrogen-bonded polypeptide structures in solution, *J. Phys. Chem.*, **62**, 1485. [Рассмотрена модель типа «застежка-молния».]
- Волькенштейн М. В.* Молекулярная биофизика. — М.: Наука, 1975. [В гл. 4 рассмотрен переход спираль — клубок.]
- Zimm B. H., Bragg J. K.*, 1959. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains, *J. Chem. Phys.*, **31**, 526. [Классическая работа, посвященная матричным методам.]

Специальная

- Brant D. A.*, 1968. Conformational energy estimates for helical polypeptide molecules, *Macromolecules*, **1**, 291.
- Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B., Kozitsyn S. A.*, 1977. Theory of protein molecule self-organization. II. A comparison of calculated thermodynamic parameters of local secondary structures with experiments, *Biopolymers*, **16**, 497. [Оценены константы перехода спираль — клубок для природных аминокислот.]
- Gibbs J. H., DiMarzio E. A.*, 1959. Statistical mechanics of helix—coil transitions in biological macromolecules, *J. Chem. Phys.*, **30**, 271.
- Hill T. L.*, 1959. Generalization of the one-dimensional Ising model applicable to helix transitions in nucleic acids and proteins, *J. Chem. Phys.*, **30**, 383.
- Lifson S., Roig A.*, 1961. On the theory of the helix—coil transition in polypeptides, *J. Chem. Phys.*, **34**, 1963.
- Peller L.*, 1959. On a model for the helix—coil transition in polypeptides, *J. Phys. Chem.*, **63**, 1194.
- Schellman J. A.*, 1955. The stability of hydrogen bonded peptide structures in aqueous solution, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim.*, **29**, 230.
- Scheraga H. A.*, 1978. Use of random copolymers to determine the helix—coil stability constants of the naturally occurring amino acids, *Pure and Applied Chemistry*, **50**, 315.

Глава 21 Конформационное равновесие в полипептидах и белках: обратимое сворачивание белков

21.1. Конформационные переходы в белках

Кооперативный переход порядок — беспорядок для одноцепочечных полипептидов, рассмотренный в гл. 20, наблюдается также и в белках, которые могут обратимо переходить из нативного состояния в денатурированное. Для большинства изученных белков, однако, переход между упорядоченными и неупорядоченными формами не является классическим переходом спираль — клубок, так как многие нативные белковые молекулы представляют собой компактно упакованные глобулы, не похожие на спиральные стержни (несмотря на то, что они могут содержать спиральные участки). Таким образом, хотя кооперативные переходы порядок — беспорядок в полипептидах и белках в общих чертах сходны, между ними имеются существенные различия, и, следовательно, можно ожидать, что механизм кооперативности для этих двух систем неодинаков.

Основная цель изучения процессов сворачивания и разворачивания белков состоит в том, чтобы выяснить, какие факторы определяют формирование нативной структуры. Поэтому многие рассматриваемые в гл. 5 вопросы (посвященные силам, стабилизирующим нативную структуру) имеют самое прямое отношение к настоящему обсуждению. В этой главе, однако, мы сосредоточим внимание главным образом на физико-химических особенностях процесса сворачивания — разворачивания. Другой, не менее важной целью является выяснение самого механизма сворачивания. Особый интерес к этой проблеме объясняется тем, что, как уже обсуждалось в гл. 5, одной из наиболее замечательных особенностей белковых молекул является их тенденция принимать единственную, специфическую конформацию — нативную форму, несмотря на астрономически большое число принципиально возможных конформаций. Детально рассматривая термодинамические и кинетические особенности процессов сворачивания и разворачивания, мы можем надеяться, что нам удастся выяснить, существуют ли частично свернутые промежуточные состояния и можно ли описать особенности их структуры. Возможно, например, что в каких-то определенных участках развернутой цепи легко образуются α -спирали или β -слои, служащие центрами нуклеации, на которых строится остальная структура. Можно думать также, что в других местах цепи (например, там, где имеются особые скопления гидрофобных боковых групп) относительно легко формируются другие типы вторичной структуры, тоже играющие роль центров нуклеации. Если такие зародыши (центры нуклеации) действительно образуются в белках и если бы удалось показать, что они связаны с какими-нибудь особенностями первичной структуры, то задача предсказания трехмерной структуры белков исходя из данных об их аминокислотной последовательности могла бы быть значительно упрощена. Например, можно было бы распознать участки последовательности, в которых с высокой вероятностью формируется определенный тип вторичной структуры, и попытаться построить трехмерную конформацию, используя эти области в качестве фундамента для построения структуры в целом.

Многие из этих соображений сводятся к вопросу о том, можно ли обнаружить какие-нибудь промежуточные состояния на пути между свернутой и денатурированной формами. В этой главе мы рассмотрим прежде всего общие закономерности и термодинамические аспекты процесса сворачивания — разворачивания. Затем мы подробно остановимся на равновесных измерениях, обращая особое внимание на возможность выявления промежуточных состояний между нативной и денатурированной формами. Будет показано, что весьма эффективными в этом отношении являются также кинетические подходы, метод, основанный на использовании репортер-

ских групп, и ЯМР. Все это позволит получить довольно ясное (хотя и не полное) представление о кооперативном механизме процесса сворачивания белков.

21.2. Температурный диапазон, в котором происходит равновесное сворачивание — разворачивание

Рис. 21.1 иллюстрирует типичное изменение физических свойств белков в процессе тепловой денатурации. На нем представлена зависимость коэффициента экстинкции при 287 нм от температуры для рибонуклеазы А. Этот белок с небольшой молекулярной массой ($M \approx 14\,000$) состоит из одной полипептидной цепи и содержит четыре внутрицепочечные дисульфидные связи (см. обсуждение в гл. 16). Приведены кривые для пяти значений pH в интервале между 1,1 и 3,2. При длине волны 287 нм коэффициент экстинкции весьма чувствителен к изменению окружения шести остатков тирозина (остатки триптофана отсутствуют) и во всех случаях резко изменяется в довольно узком диапазоне температур. До и после области перехода коэффициент экстинкции плавно меняется с ростом температуры¹.

Резкое изменение коэффициента экстинкции связано с существенным изменением конформации в данном температурном диапазоне. Это можно доказать, например измеряя характеристическую вязкость до и после перехода. Такие измерения свидетельствуют о том, что молекула переходит из компактной формы в развернутую, в которой, однако, сохраняются все четыре дисульфидные связи.

Быстрое изменение коэффициента экстинкции обусловлено резкой перестройкой в окружении остатков тирозина. Более постепенное изменение поглощения за пределами области перехода объясняется главным образом слабой зависимостью коэффициента экстинкции от температуры.

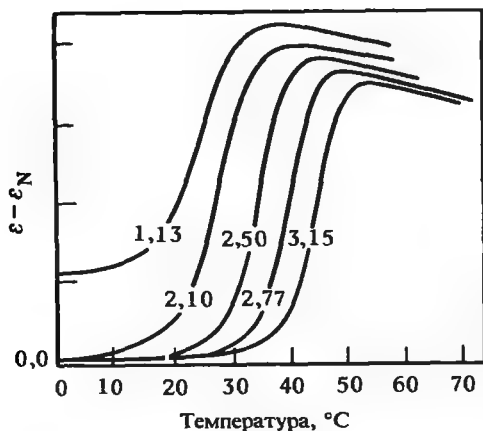


РИС. 21.1. Изменение физических свойств белка при тепловой денатурации. Зависимость коэффициента экстинкции при 287 нм от температуры для рибонуклеазы при пяти значениях pH. (Brandts J. F., Hunt L., J. Am. Chem. Soc., 89, 4826, 1967.)

¹ Проблему плавного изменения коэффициента экстинкции до и после перехода можно разрешить, снимая разностные спектры, как это описано Приваловым и др. (см. Khechinashvili et. al., - FEBS Lett., 30, 57, 1973).

21.3. Нахождение термодинамических параметров: простая модель двух состояний

Используя для описания процесса денатурации простую модель двух состояний, мы можем на основе данных рис. 21.1 найти константу равновесия K :

$$K = (D)/(N) \quad (21.1)$$

$$= [\varepsilon(T) - \varepsilon_N(T)] / [\varepsilon_D(T) - \varepsilon(T)] \quad (21.2)$$

где D и N — денатурированная и нативная формы, $\varepsilon(T)$ — коэффициент экстинкции при температуре T , а $\varepsilon_N(T)$ и $\varepsilon_D(T)$ — коэффициенты экстинкции нативной и денатурированной форм соответственно при этой температуре. Термодинамические параметры ΔG^0 , ΔH^0 и ΔS^0 можно найти с помощью следующих соотношений:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (21.3)$$

$$\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0) / T \quad (21.4)$$

$$\Delta H^0 = -R[\partial(\ln K)/\partial(1/T)]_p \quad (21.5)$$

а изменение теплоемкости при постоянном давлении ΔC_p^0 равно

$$\Delta C_p^0 = (\partial \Delta H^0 / \partial T)_p = T(\partial \Delta S^0 / \partial T)_p \quad (21.6)$$

ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛИ ДВУХ СОСТОЯНИЙ К РИБОНУКЛЕАЗЕ

В табл. 21.1 приведены значения различных термодинамических параметров, характеризующих процесс денатурации рибонуклеазы, для трех низких значений рН и температуры 30°C (при таких рН относительная стабильность нативной формы уменьшается достаточно сильно, чтобы можно было изучать процесс денатурации в удобном температурном диапазоне). При этих условиях ΔH^0 и ΔS^0 довольно велики и положительны, а величина ΔG^0 относительно мала. Существенное увеличение энтропии в процессе денатурации показывает, что при 30°C энергия нативной формы значительно ниже, чем денатури-

Таблица 21.1

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
ДЕНАТУРАЦИИ РИБОНУКЛЕАЗЫ ПРИ 30°C¹⁾, ²⁾

рН	ΔG^0 , ккал · моль ⁻¹	ΔH^0 , ккал · моль ⁻¹	ΔS^0 , кал · град ⁻¹ · моль ⁻¹	ΔC_p^0 , кал · град ⁻¹ · моль ⁻¹
1,13	-1085	60,3	202	2072
2,50	912	57,2	186	1985
3,15	3094	53,0	165	1987

¹⁾ Brandts J. F., Hunt L., J. Am. Chem. Soc., 89, 4826, 1967.

²⁾ Расчет производился в рамках модели двух состояний.

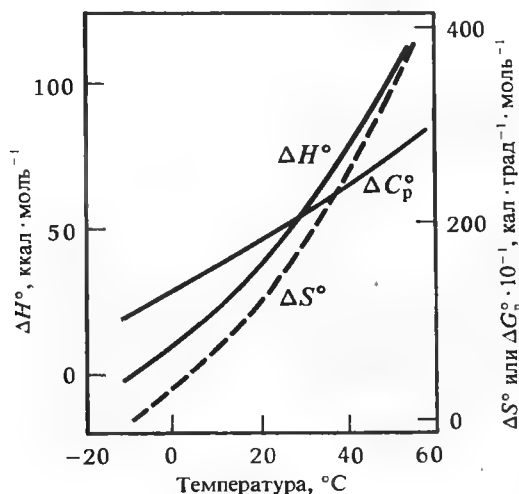


РИС. 21.2. Зависимость от температуры термодинамических параметров перехода рибонуклеазы из нативного состояния в денатурированное при pH 2,5. (Brandis J. F., Hunt L., J. Am. Chem. Soc., 89, 4826, 1967.)

рованной. Увеличение энтропии при денатурации соответствует увеличению беспорядка при этом процессе. Вызывает удивление большое увеличение теплоемкости — примерно на $2000 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ (табл. 21.1). Оно связано с тем, что в ходе денатурации алифатические и ароматические группы становятся доступными для растворителя. Известно, что водные растворы неполярных молекул такого типа имеют большие теплоемкости, и обычно эти группы бывают частично или полностью спрятаны внутри нативной структуры.

Большая величина ΔC_p^0 отражает сильную температурную зависимость ΔH^0 и ΔS^0 [см. уравнение (21.6)]. Кроме того, и сама ΔC_p^0 тоже зависит от температуры. На рис. 21.2 представлены кривые, иллюстрирующие изменение величин ΔH^0 , ΔS^0 и ΔC_p^0 (при pH 2,5) в широком температурном диапазоне. Ясно видна очень сильная зависимость указанных параметров от температуры. Частично эти эффекты можно объяснить изменением структуры растворителя и характера сольватации. Например, при низких температурах вокруг неполярных групп денатурированных молекул образуются сольватированные структуры из молекул воды. При повышении температуры такие структуры становятся менее стабильными. Таким образом, положительный вклад сольватации в энтропию денатурации растет с увеличением температуры.

ПРЕДСКАЗАНИЕ «ХОЛОДНОЙ» ДЕНАТУРАЦИИ

Тот факт, что термодинамические параметры резко меняются с изменением температуры, причем ΔG^0 имеет максимум, приводит к интересному предположению, что белок может подвергаться не только тепловой, но и «холодной» денатурации. Рис. 21.3 иллюстрирует это положение для рибонуклеазы при тех же значениях pH, что и приведенные на рис. 21.1. [Для того чтобы подчеркнуть, что максимум ΔG^0 соответствует минимуму свободной энергии нативной формы (относительно свободной энергии денатурированного состояния), вертикальная ось на рис. 21.3 проведена так, чтобы было видно постепенное увеличение ΔG^0 (она становится все более положительной) по мере приближения к началу координат.] Точки на графике получены из экспериментальных данных, приведенных на рис. 21.1, а кривые рассчитаны для более широкого диапазона, чем тот, который можно охватить в эксперименте. Отметим, что при этих значениях pH свободная энергия стабилизации нативной формы составляет всего от 0 до $5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ при тем-

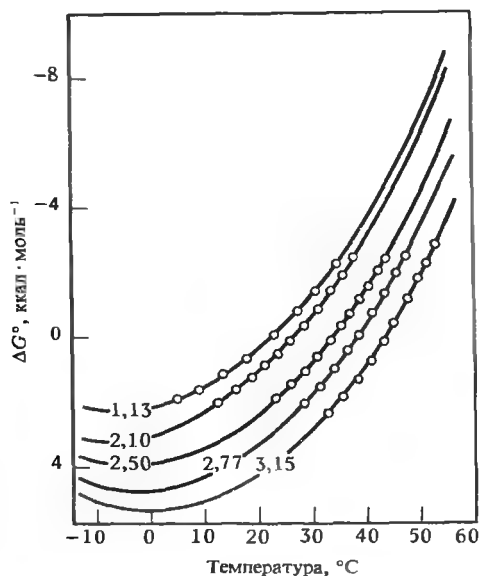


РИС. 21.3. Наличие минимумов на кривых зависимости ΔG^0 от температуры для рибонуклеазы при пяти значениях pH. Точки соответствуют экспериментальным данным; кривые получены расчетным путем. (Brandts J. F., Hunt L., J. Am. Chem. Soc., **89**, 4826, 1967.)

пературе, близкой к комнатной. Отметим также, что во всех случаях ΔG^0 достигает максимума в интервале от 0 до -10°C , а затем уменьшается с понижением температуры. К сожалению, максимальная стабильность нативной молекулы достигается вне области, доступной экспериментальному измерению, и пока не удалось прямо наблюдать «холодную» денатурацию рибонуклеазы в этих условиях.

Впервые существование температуры наибольшей стабильности было продемонстрировано для β -лактоглобулина в водных растворах мочевины. На рис. 21.4 приведены графики зависимости оптического вращения раствора β -лактоглобулина от температуры при

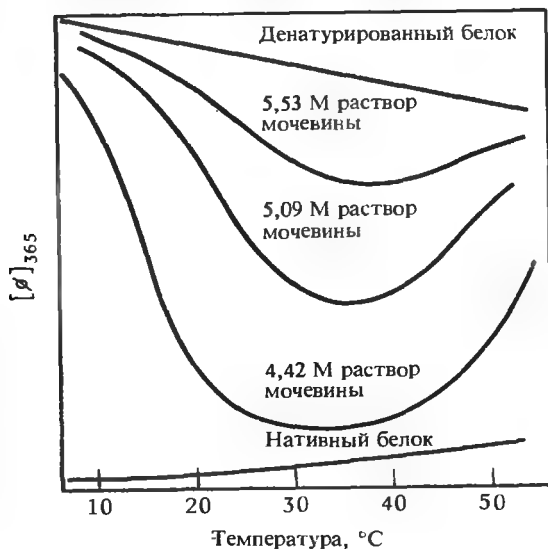


РИС. 21.4. Температура наибольшей стабильности для β -лактоглобулина в водном растворе мочевины. Зависимость оптического вращения при 365 нм от температуры раствора при трех разных концентрациях мочевины. Верхняя и нижняя кривые — изменение оптического вращения полностью денатурированной и нативной форм соответственно. (Pace N. C., Tapford C., Biochemistry, **7**, 198, 1968.)

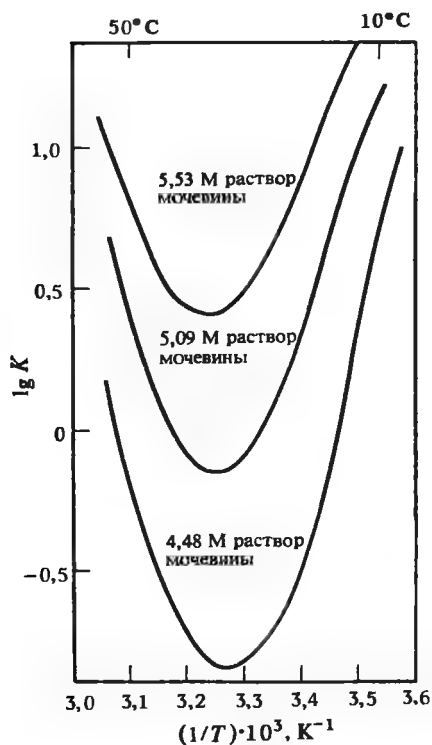


РИС. 21.5. Типичные кривые Вант-Гоффа. Данные получены из температурных кривых, приведенных на рис. 21.4. (Pace N. C., Tanford C., Biochemistry, 7, 198, 1968.)

Таблица 21.2

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ,
ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ ПРОЦЕСС ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ¹⁾

Белки (условия)	ΔG^0 , ккал · моль ⁻¹	ΔH^0 , ккал · моль ⁻¹	ΔS^0 , кал · град ⁻¹ · моль ⁻¹	ΔC_p^0 , кал · град ⁻¹ · моль ⁻¹	Температура наиболь- шей стабиль- ности, °C
Рибонуклеаза (рН 2,5; 30°C)	+0,9	+57	+185	+2000	-9
Химотрипсиноген (рН 3; 25°C)	+7,3	+39	+105	+2600	10
Миоглобин (рН 9; 25°C)	+13,6	+42	+95	+1400	<0
β -Лактоглобулин (5 М мочевины; рН 3; 25°C)	+0,6	-21	-72	+2150	35

¹⁾Tanford C., Adv. Protein Chem., 23, 121, 1968

365 нм для трех разных условий. Все три кривые имеют минимум. Предположив, что переход происходит по принципу «все или ничего», мы можем из этих данных найти константу равновесия K . На рис. 21.5 представлены графики зависимости вычисленных значений $\lg K$ от $1/T$ для тех же самых условий, что и на рис. 21.4. Все кривые имеют минимум, и, следовательно, ΔH^0 действительно меняет знак. Найдено, что в этом случае $\Delta C_p^0 \cong 2100 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$.

Подобным образом были исследованы и другие белки. В табл. 21.2 приведены термодинамические параметры для рибонуклеазы, химотрипсина, миоглобина и β -лактоглобулина при температурах, близких к комнатной. Приводятся также значения температуры наибольшей стабильности при указанных условиях. Отметим, что температура наибольшей стабильности существует для всех указанных макромолекул. Такая общность позволяет считать этот параметр некой характеристикой белков. Однако температура наибольшей стабильности для случаев, приведенных в табл. 21.2, наблюдается только при особых рН или в присутствии денатурирующего агента.

21.4. Поиски промежуточных состояний: равновесные исследования

ЧАСТИЧНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ И ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

В разд. 21.3 мы предположили, что процесс денатурации белков происходит по принципу «все или ничего». Приведенные данные хорошо согласуются с этим предположением. Тем не менее нет достаточных оснований считать, что переход действительно является именно таким только потому, что один набор равновесных измерений согласуется с моделью двух состояний.

Каков же действительный механизм сворачивания и разворачивания? Образуются ли при переходе промежуточные состояния? Эти вопросы очень интересны. На рис. 21.6 представлены три возможные схемы, описывающие механизм перехода. Согласно схеме I, произвольно свернутая цепь в результате согласованного процесса превращается в на-

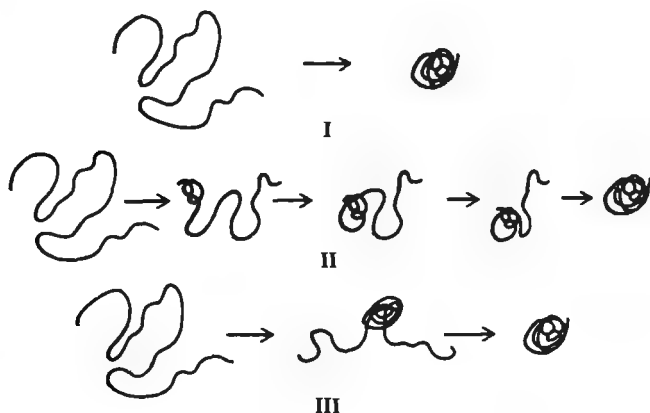


РИС. 21.6. Три гипотетические схемы процесса сворачивания белковой молекулы, находящейся вначале в состоянии статистического клубка.

тивную форму, не проходя никаких промежуточных состояний. Это истинный процесс двух состояний. В механизме, описываемом схемой II, белковая молекула постепенно «сворачивается», начиная с одного конца (например, с N-конца), и проходит через непрерывный ряд промежуточных состояний. Согласно механизму III, сначала образуется «сердцевина», или центр нуклеации в середине цепи, а затем вокруг этого ядра формируется вся структура. Структуру с ядром тоже можно рассматривать как промежуточное состояние. Помимо этих трех, можно предложить и другие механизмы. Пусть, например, процесс может быть схематически представлен в виде

$$N \rightleftharpoons X_1 \rightleftharpoons X_2 \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons D \quad (21.7)$$

где X_i — стабильные промежуточные состояния¹. При измерении некоей физической величины y в зависимости от температуры мы получим средние значения y для различных форм, представленных на схеме (21.7), с весовыми коэффициентами, соответствующими доле этих форм. Рассмотрим, что дадут расчеты в том случае, когда доля денатурированных молекул определяется из экспериментальных данных, и можно ли установить наличие промежуточных форм в подобных ситуациях на основе измерения этого физического параметра в состоянии равновесия.

Пусть наблюдаемое значение некоторого физического параметра y равно

$$y = f_N y_N + f_D y_D + \sum_i f_i y_i \quad (21.8)$$

где индексы i , D и N относятся к i -му промежуточному состоянию, денатурированной и нативной формам соответственно, f — доля каждой из перечисленных форм. Подставляя в (21.8) выражение для f_N (из уравнения сохранения суммарного числа молекул)

$$f_N = 1 - f_D - \sum_i f_i \quad (21.9)$$

после преобразования получим выражение для кажущейся степени денатурации $f_{\text{каж}}$

$$f_{\text{каж}} = (y - y_N)/(y_D - y_N) = f_D + \sum_i f_i d_i \quad (21.10)$$

где

$$d_i = (y_i - y_N)/(y_D - y_N) \quad \text{и} \quad 0 \leq d_i \leq 1 \quad (21.11)$$

Условие $0 \leq d_i \leq 1$ подразумевает, что значение физического параметра i -го промежуточного состояния находится между его значениями для нативной и денатурированной форм (ясно, что это предположение ограничивает общность нашей модели). Значение физического параметра i -го промежуточного состояния близко к таковому для денатурированного состояния, если $d_i \cong 1$, и для нативного, если $d_i \cong 0$.

Кажущаяся константа равновесия $K_{\text{каж}} = ({}^{\circ}D)/({}^{\circ}N)$ равна

$$K_{\text{каж}} = f_{\text{каж}}/(1 - f_{\text{каж}}) \quad (21.12)$$

¹ Последующие выкладки частично основываются на идеях Тэнфорда (Charles Tanford, 1968), в основе которых лежит предположение о том, что денатурированное (развернутое) состояние представлено молекулами одного вида. Как указывается в разд. 21.7, это предположение не всегда справедливо, по крайней мере для рибонуклеазы, а возможно, и для других белков. Однако механизм (21.7) является хорошей отправной точкой для анализа процесса сворачивания белковых молекул, а дальнейшие уточнения могут быть сделаны путем модификации этой простой схемы.

Отметим, что $(1 - f_{\text{каж}})$ — это кажущаяся доля нативных молекул. Введем истинные константы равновесия $K_i = f_i/f_N$ и $K_D = f_D/f_N$. Используя формулы (21.9), (21.10) и (21.12), получим

$$f_{\text{каж}}/f_N = K_D \left(1 + \sum_i d_i K_i / K_D \right) \quad (21.13)$$

$$(1 - f_{\text{каж}})/f_N = 1 + \sum_i (1 - d_i) K_i \quad (21.14)$$

$$K_{\text{каж}} = K_D \left(1 + \sum_i d_i K_i / K_D \right) / \left(1 + \sum_i (1 - d_i) K_i \right) \quad (21.15)$$

Следует помнить, что обычно измеряют только $K_{\text{каж}}$, а не K_D . Согласно формуле (21.15), $K_{\text{каж}} = K_D$ при $K_i = 0$ для всех i , т.е. в отсутствие промежуточных состояний. При $K_i \neq 0$ $K_{\text{каж}} \neq K_D$, даже если все промежуточные состояния по данному физическому свойству близки к нативному ($d_i = 0$) или идентичны полностью денатурированному ($d_i = 1$) состояниям. Кроме того, ясно, что в *общем случае* численное значение $K_{\text{каж}}$ (или $f_{\text{каж}}$) зависит не только от констант термодинамического равновесия, но и от того, какая

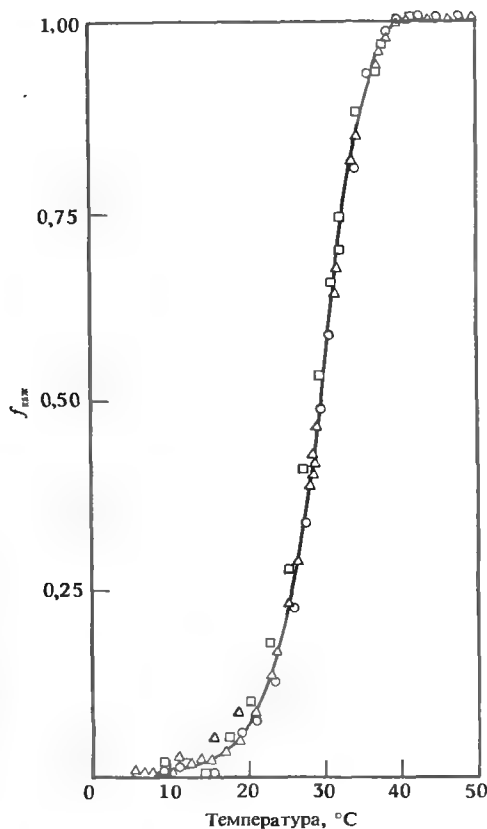


РИС. 21.7. Зависимость кажущейся степени денатурации от температуры для рибонуклеазы при pH 2,1. Все точки, полученные по данным измерения характеристической вязкости ($\square$), оптического вращения при 365 нм ($\circ$) и оптической плотности ($\triangle$), ложатся на одну и ту же кривую. (Ginsburg A., Carroll W. R., Biochemistry, 4, 2159, 1965.)

именно физическая характеристика измеряется. Эта зависимость будет отсутствовать только в том случае, если никаких промежуточных состояний не существует. Исходя из этого, можно создать простой тест на существование промежуточных состояний. Изменяя зависимость $f_{\text{каж}}$ от температуры для различных физических свойств, мы получим разные значения $f_{\text{каж}}$, если промежуточные состояния существуют, так как вряд ли d_i окажутся одинаковыми для всех физических свойств.

На рис. 21.7 представлена зависимость $f_{\text{каж}}$ от температуры для рибонуклеазы. Чтобы рассчитать $f_{\text{каж}}$, измеряли три разные физические величины — оптическую плотность, оптическое вращение и характеристическую вязкость. Видно, что все три вида данных ложатся на одну кривую во всем исследуемом температурном диапазоне. Очевидно, что переход при этих условиях совершается по принципу «все или ничего».

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ТЕСТ НА СУЩЕСТВОВАНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ

Второй тест на существование промежуточных состояний основан на сравнении энтальпии перехода, измеренной калориметрически, с энтальпией Вант-Гоффа, полученной из температурной зависимости $K_{\text{каж}}$. Калориметрические измерения количества тепла, выделяющегося при переходе из полностью нативного в полностью денатурированное состояние, дают величину ΔH_D . Кажущееся количество тепла процесса, полученное из соотношения Вант-Гоффа, определяется следующим уравнением:

$$\partial(\ln K_{\text{каж}})/\partial T = \Delta H_{\text{каж}}/RT^2 \quad (21.16)$$

Продифференцировав уравнение (21.15), после упрощения получим

$$\Delta H_{\text{каж}} = \Delta H_D \left(1 - \frac{\sum_i d_i (K_i/K_D) (1 - \Delta H_i/\Delta H_D)}{1 + \sum_i d_i (K_i/K_D)} - \frac{\sum_i (1 - d_i) K_i (\Delta H_i/\Delta H_D)}{1 + \sum_i (1 - d_i) K_i} \right) \quad (21.17)$$

где

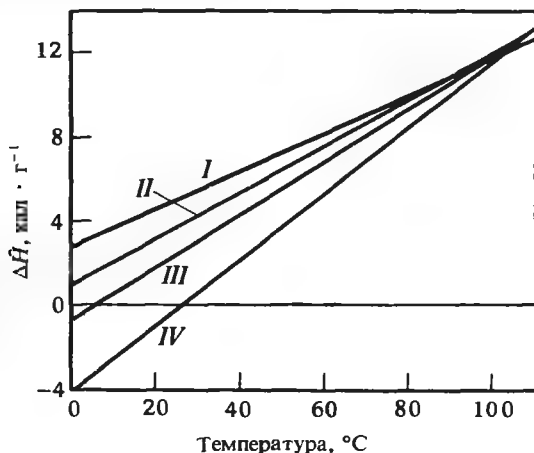
$$\partial(\ln K_i)/\partial T = \Delta H_i/RT^2 \quad (21.18)$$

Отметим, что ΔH_i есть изменение энтальпии при переходе из состояния N в X_i . Если мы, как и раньше, предположим, что $0 \leq d_i \leq 1$ и $(\Delta H_i/\Delta H_D) \leq 1$, то оба частных (содержащих операции суммирования) в уравнении (21.17) будут больше или равны нулю. При этих условиях $|\Delta H_{\text{каж}}| \leq |\Delta H_D|$, и если промежуточные состояния отсутствуют, то $\Delta H_{\text{каж}} = \Delta H_D$.

Причины, по которым при наличии промежуточных состояний выполняется соотношение $|\Delta H_{\text{каж}}| \leq |\Delta H_D|$, ясны. Полученное с помощью уравнения Вант-Гоффа соотношение (21.17) определяет количество тепла, усредненное по всем участвующим в процессе реакциям. Поскольку предполагается, что теплота перехода из свернутого в промежуточное состояние меньше, чем для перехода в полностью развернутую форму, частично развернутые состояния входят с весами, отвечающими меньшему количеству тепла.

Развитие сканирующей микрокалориметрии позволило прямо и с высокой точностью измерять изменение энтальпии в процессе денатурации для многих белков (обсуждение вопросов калориметрии см. в Дополнении 21.1). Выдающихся успехов в этой области достигли П. Л. Привалов и сотр. в Советском Союзе. На рис. 21.8 суммируются калориметрические данные, полученные при денатурации рибонуклеазы, лизоцима, химотрипсина и миоглобина. Изменения энтальпии приведены в расчете на 1 г и обозначены через $\Delta \bar{H}$. Во

РИС. 21.8. Температурная зависимость разности энтальпий для денатурированного и нативного состояний глобулярных белков. На графике приведена зависимость величины $\Delta\hat{H}$, измеренной калориметрически, от температуры. I — рибонуклеаза, II — лизоцим, III — химотрипсин, IV — миоглобин. (Privalov P. L., FEBS Letts., 40, S140, 1974.)

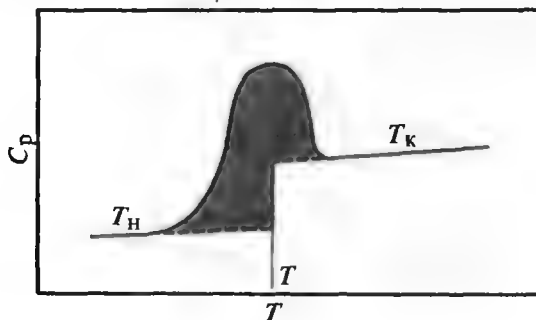


Дополнение 21.1

КАЛОРИМЕТРИЯ

Дифференциальная сканирующая калориметрия получила в последние годы широкое применение и оказалась весьма ценным инструментом для исследования разнообразных систем. В основе метода лежит измерение количества поглощенного системой тепла при повышении температуры от некоторой начальной точки до конечной, в ходе которого в системе происходит один или несколько переходов (примером могут служить конформационные изменения в системах, состоящих из белков, которые растворены в водной среде). Аналогичные измерения производятся одновременно в соответствующем эталонном растворе, с тем чтобы исключить побочные тепловые эффекты. Данные, полученные для белка в буферном растворе, сравниваются с данными для чистого буфера.

Результаты обычно представляют в виде графика зависимости C_p (теплоемкости при постоянном давлении) от температуры. Для одноступенчатого перехода, подобного тому, который имеет место при конформационных изменениях в белке, происходящих по схеме $N \rightleftharpoons D$, получается кривая, аналогичная приведенной ниже. Максимум C_p наблюдается в области перехода белка из нативного состояния в денатурированное.



Чтобы найти ΔH перехода, предположим, что температура увеличивается от начального значения T_n до конечного T_k (выше области перехода). Суммарное изменение количества тепла $\Delta H_{\text{сум}}$ при этом равно

$$\Delta H_{\text{сум}} = \int_{T_n}^{T_k} C_p dT$$

где C_p — кажущаяся (измеренная) теплоемкость при постоянном давлении. В $\Delta H_{\text{сум}}$ входит не только изменение энтальпии при переходе из N в D, но и «фоновое» количество тепла, поглощаемого молекулами в состояниях N и D, присутствующих в данном интервале температур.

Чтобы найти именно $\Delta H(T)$ — изменение энтальпии, связанное с переходом при температуре T , нужно вычлсть из $\Delta H_{\text{сум}}$ вклады, связанные с поглощением тепла молекулами, находящимися в состоянии N в интервале температур от T_n до T , и молекулами, находящимися в состоянии D при температурах от T до T_k :

$$\Delta H(T) = \Delta H_{\text{сум}} - \int_{T_n}^T C_p^N dT - \int_T^{T_k} C_p^D dT$$

где C_p^N и C_p^D — теплоемкости форм N и D соответственно. Из рисунка видно, что $\Delta H(T)$ определяется площадью затененной области под кривой. С помощью записанного выше уравнения можно найти $\Delta H(T)$ при любой температуре между T_n и T_k .

Для некоторых систем на графике зависимости C_p от T наблюдается больше чем один максимум. Это свидетельствует о том, что в системе происходит несколько структурных переходов при разных температурах.

Более подробно этот важный экспериментальный подход рассмотрен в работах Sturtevant J. H., Adv. Biophys. Bioeng., 33, 35, 1974; Krishnan K. S., Brandts J. F., Methods in Enzymol., 49, 3, 1978.

Во всех случаях значения ΔH возрастают с увеличением температуры и сходятся при высоких температурах. Была измерена также энтальпия Вант-Гоффа; во всех случаях результаты совпадали с данными для соответствующих белков, полученными калориметрически. Таким образом, сравнение этих двух типов данных не выявило промежуточных состояний.

21.5. Кинетические исследования процесса сворачивания белков

Выше мы рассмотрели, как из равновесных данных можно извлечь информацию о механизме обратимого разворачивания белковых молекул. Однако значительно более ценными в этом отношении являются кинетические исследования, позволяющие исключить некоторые из возможных механизмов.

Сворачивание и разворачивание белковой цепи — это внутримолекулярный процесс. Следовательно, он может быть описан кинетическим уравнением первого порядка. Это означает, что концентрация молекул данного типа может быть представлена в виде суммы одного или больше экспоненциальных членов, $\sum_i A_i e^{-\lambda_i t}$, где параметры λ_i — характер-

ные константы скоростей, а A_i — не зависящие от времени амплитуды [см. гл. 16 и уравнение (16.20)]. Детальный анализ кинетики процесса сворачивания — разворачивания белков был выполнен Икаи и Тэнфордом (A. Ikai, C. Tanford, 1971), и мы будем следовать основным положениям, разработанным этими авторами.

КИНЕТИКА В СЛУЧАЕ МОДЕЛИ ДВУХ СОСТОЯНИЙ

Предположим, что исходно в системе присутствуют только нативные или только денатурированные белковые молекулы. Затем в результате скачкообразного изменения температуры, состава растворителя или какого-нибудь другого параметра системы белок сворачивается или разворачивается и образуется смесь нативных и денатурированных молекул. Для реакции



кинетическое уравнение имеет вид

$$-d(N)/dt = k_1(N) - k_{-1}(D) \quad (21.20)$$

или

$$-df_N/dt = k_1 f_N - k_{-1} f_D \quad (21.21)$$

Уравнение (21.21) получено путем деления обеих частей (21.20) на константу, равную сумме $(N) + (D)$. Представим f_N и f_D в следующем виде: $f_N = \bar{f}_N + \Delta f_N$ и $f_D = \bar{f}_D + \Delta f_D$, где черта указывает долю соответствующей формы в равновесии, а Δf представляет собой отклонение от равновесных значений. Производя подстановку f_N и f_D в уравнение (21.21), получим

$$-d\Delta f_N/dt = (k_1 + k_{-1})\Delta f_N \quad (21.22)$$

При выводе уравнения (21.22) использовались также соотношение $\Delta f_N = -\Delta f_D$ (которое следует из уравнения материального баланса $f_D + f_N = \text{const}$) и условие равновесия $k_1 \bar{f}_N = k_{-1} \bar{f}_D$. Решение уравнения (21.22) имеет вид

$$\Delta f_N = \Delta f_N^0 e^{-\lambda t} \quad (21.23)$$

где $\lambda = k_1 + k_{-1}$, а Δf_N^0 — это значение Δf_N при $t = 0$. (Заметим, что мы используем тот же подход к решению кинетического уравнения, что и в гл. 16 для мономолекулярных реакций.) На рис. 21.9 представлен общий вид зависимости f_N от времени, поясняющий смысл параметров Δf_N , Δf_N^0 и f_N .

В общем случае мы измеряем некий физический параметр y , где

$$y = f_N y_N + f_D y_D \quad (21.24)$$

Удобно использовать переменную Δy , такую, что

$$\Delta y = y - \bar{y} = y_N \Delta f_N + y_D \Delta f_D \quad (21.25)$$

$$= (y_N - y_D) \Delta f_N^0 e^{-\lambda t} \quad (21.26)$$

$$= \Delta y_0 e^{-\lambda t} \quad (21.27)$$

и

$$\Delta y / \Delta y_0 = e^{-\lambda t} \quad (21.28)$$

где Δy_0 есть отклонение Δy при $t = 0$ от конечного равновесного значения $\bar{y}$.

Из уравнения (21.28) видно, что в рамках модели двух состояний графиком зависимости $\ln(\Delta y / \Delta y_0)$ от t является прямая, наклон которой не зависит от начальных условий и изме-

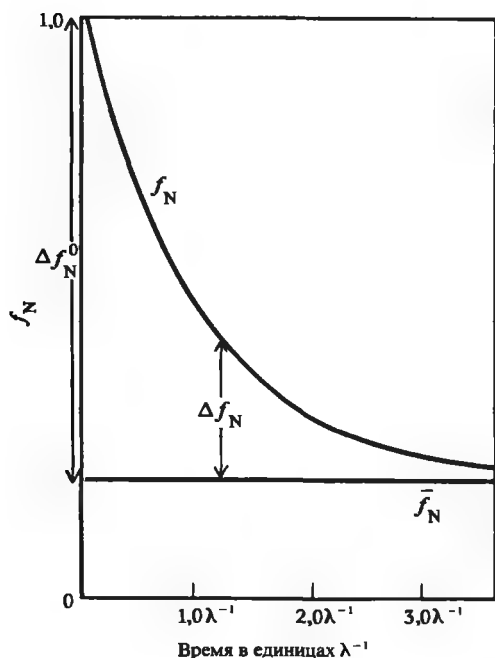


РИС. 21.9. Общий вид зависимости f_N от времени, иллюстрирующий смысл параметров, которые обсуждаются в тексте.

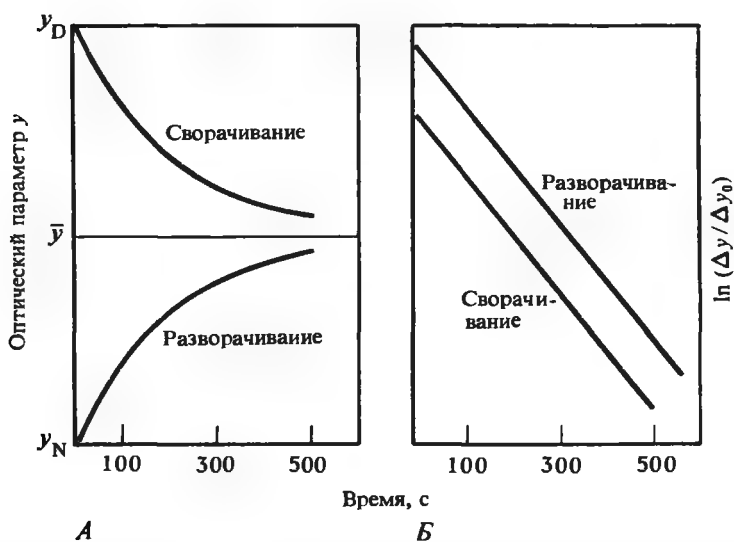


РИС. 21.10. Кинетика сворачивания и разворачивания лизоцима. А. Зависимость оптической плотности при 301 нм от времени в процессе сворачивания и разворачивания лизоцима в 2,5 М гуанидин-гидрохлориде (рН 2,6) при 25°C. Б. Эти же данные в полулогарифмическом масштабе. Кривые сдвинуты друг относительно друга на постоянную величину. (Ikai A., Tanford C., *Nature*, **230**, 100, 1971.)

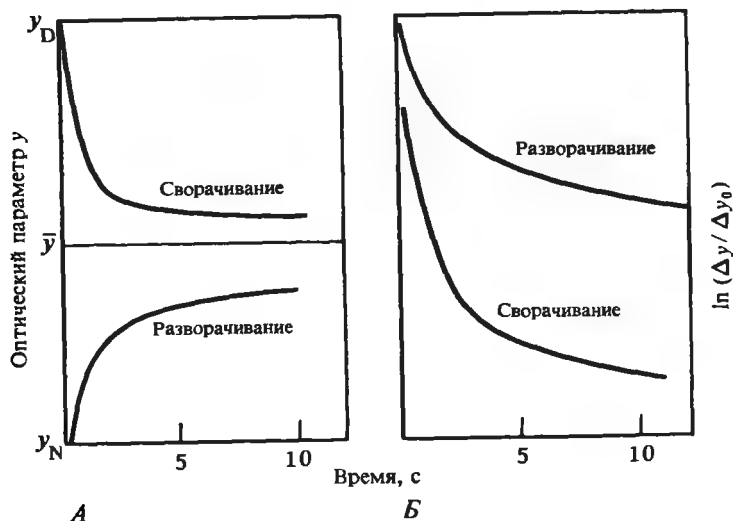


РИС. 21.11. Кинетика сворачивания и разворачивания цитохрома с. Кривые аналогичны приведенным на рис. 21.10 для лизоцима. Одна из кривых на рис. Б смещена по вертикали, чтобы взаимное расположение кривых стало более ясным. (Ikai A., Tanford C., *Nature*, 230, 100, 1971.)

ряемого параметра. Прекрасной иллюстрацией этого служит кинетика разворачивания и сворачивания лизоцима при определенных условиях. На рис. 21.10,А приведен график зависимости y (поглощение при 301 нм) от времени при денатурации и ренатурации лизоцима в 2,5 М растворе гуанидингидрохлорида. На рис. 21.10,Б те же данные представлены в полулогарифмическом масштабе. Видно, что в этом случае результаты кинетических экспериментов очень хорошо согласуются с простой моделью двух состояний без промежуточных форм.

Рассмотрим, однако, другую систему — цитохром с. На рис. 21.11,А представлена зависимость поглощения этого белка при 400 нм от времени для случая, когда оба процесса — сворачивания и разворачивания — протекают в 2,5 М растворе гуанидингидрохлорида. Ясно видно, что построенные в полулогарифмическом масштабе графики (рис. 21.11,Б) являются двухфазными, что указывает на неприменимость модели двух состояний. Более того, следует отметить, что точная форма этих кривых зависит от начальных условий.

Двухфазность кинетики означает, что процесс сворачивания — разворачивания состоит из двух этапов. (В общем случае, если на графике наблюдается n фаз, процесс состоит из n независимых этапов; см. гл. 16.) Однако интерпретация кинетических результатов в рамках какого-либо одного механизма требует осторожности. Тем не менее, как мы увидим, при соответствующих мерах предосторожности полученные результаты позволяют исключить многие возможные модели и достаточно надежно выбрать один-единственный механизм.

КИНЕТИКА В СЛУЧАЕ МОДЕЛИ ТРЕХ СОСТОЯНИЙ

Трудности, которые возникают при использовании кинетического подхода (а также возможности этого метода), лучше всего проиллюстрировать, разобрав какой-нибудь конкретный пример. Предположим, что превращения цитохрома с, для которого харак-

терна двухфазная кинетика, могут быть схематически представлены как



т.е. между нативной и денатурированной формами существует только одно промежуточное состояние. Кинетические уравнения в этом случае имеют вид

$$-d(N)/dt = k_1(N) - k_{-1}(X) \quad (21.30a)$$

$$-d(D)/dt = -k_2(X) + k_{-2}(D) \quad (21.30б)$$

Существуют только два независимых кинетических уравнения, потому что изменение во времени третьего компонента, $d(X)/dt$, можно получить, сложив уравнения (21.30a) и (21.30б). Производя такие же подстановки и преобразования, как и в случае одноступенчатого механизма, и используя уравнение материального баланса $\Delta f_X = -\Delta f_N - \Delta f_D$, мы можем переписать уравнения (21.30a) и (21.30б) в виде

$$-d \Delta f_N/dt = (k_1 + k_{-1}) \Delta f_N + k_{-1} \Delta f_D \quad (21.31a)$$

$$-d \Delta f_D/dt = k_2 \Delta f_N + (k_2 + k_{-2}) \Delta f_D \quad (21.31б)$$

Мы получили систему линейных дифференциальных уравнений. Стандартный метод их решения основан на предположении, что решения можно представить в виде

$$\Delta f_N = C e^{-\lambda t} \quad (21.32a)$$

$$\Delta f_D = C' e^{-\lambda t} \quad (21.32б)$$

где C , C' и λ — константы. Подставив выражения для Δf_N и Δf_D из (21.32a, б) в уравнения (21.31a,б) и заметив, что $d \Delta f_N/dt = -\lambda \Delta f_N$ и $d \Delta f_D/dt = -\lambda \Delta f_D$ [из уравнений (21.32a,б)], получим

$$0 = (k_1 + k_{-1} - \lambda) \Delta f_N + k_{-1} \Delta f_D \quad (21.33a)$$

$$0 = k_2 \Delta f_N + (k_2 + k_{-2} - \lambda) \Delta f_D \quad (21.33б)$$

Чтобы найти нетривиальные решения этой системы однородных уравнений (т.е. решения, при которых Δf_D и Δf_N не равны нулю), нужно определить значения λ , при которых детерминант из коэффициентов при Δf_N и Δf_D становится равным нулю:

$$\begin{vmatrix} k_1 + k_{-1} - \lambda & k_{-1} \\ k_2 & k_2 + k_{-2} - \lambda \end{vmatrix} = 0 \quad (21.34)$$

или

$$f(\lambda) = \lambda^2 - \lambda(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}) + k_1 k_2 + k_1 k_{-2} + k_{-1} k_{-2} = 0 \quad (21.35)$$

Решая это квадратное уравнение, находим два его корня:

$$\begin{aligned} \lambda_{1,2} = \{ & (k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \pm [(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2})^2 \\ & - 4(k_1 k_2 + k_1 k_{-2} + k_{-1} k_{-2})]^{1/2} \} / 2 \end{aligned} \quad (21.36)$$

где знак плюс отвечает корню λ_1 (большему из двух), а знак минус — корню λ_2 . [Эта задача аналогична задаче о нахождении собственных чисел матрицы $\mathbf{M}$, см. гл. 20, уравнения (20.49) — (20.52), и задаче определения величины, обратной времени релаксации, при двух-ступенчатом механизме, уравнения (16.80) — (16.82).]

Частные решения исходных уравнений (21.31а, б) можно найти по формулам (21.32а, б) при $\lambda = \lambda_1$. При этом константы C и C' принимают значения, которые мы будем обозначать C_1 и C_3 соответственно. Подставляя (21.32а, б) в уравнение (21.33а), мы можем выразить C_3 через C_1 :

$$(k_1 + k_{-1} - \lambda_1)C_1 + k_{-1}C_3 = 0 \quad (21.37)$$

или

$$C_3 = \gamma_1 C_1 \quad (21.38)$$

где

$$\gamma_1 = (\lambda_1 - k_1 - k_{-1})/k_{-1} \quad (21.39)$$

Аналогично, используя уравнение (21.33б), можно показать, что $\gamma_1 = k_2/(\lambda_1 - k_2 - k_{-2})$. Легко видеть, что оба эти выражения для γ_1 эквивалентны. При $\lambda = \lambda_2$ константы C и C' принимают значения C_2 и C_4 ; выполнив такие же преобразования, как и выше, получим

$$C_4 = \gamma_2 C_2 \quad (21.40)$$

где

$$\gamma_2 = (\lambda_2 - k_1 - k_{-1})/k_{-1} \quad (21.41)$$

Таким образом, мы имеем два решения: $\Delta f_N = C_1 e^{-\lambda_1 t}$, $\Delta f_D = C_3 e^{-\lambda_1 t}$ и $\Delta f_N = C_2 e^{-\lambda_2 t}$, $\Delta f_D = C_4 e^{-\lambda_2 t}$. Общее решение есть просто сумма частных решений:

$$\Delta f_N = C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (21.42a)$$

$$\Delta f_D = C_3 e^{-\lambda_1 t} + C_4 e^{-\lambda_2 t} = \gamma_1 C_1 e^{-\lambda_1 t} + \gamma_2 C_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (21.42б)$$

Легко показать, что эти решения удовлетворяют исходным дифференциальным уравнениям (21.31а, б). Константы C_1 и C_2 находят из начальных условий.

На практике обычно определяют зависимость от времени не концентраций отдельных компонент, а каких-либо физических свойств системы. Как и в случае механизма, предполагающего существование одного промежуточного состояния [уравнения (21.19) — (21.38)], мы можем получить выражение для зависимости относительного изменения $\Delta y/\Delta y_0$ некоторого физического параметра y от времени:

$$\Delta y/\Delta y_0 = A_1 e^{-\lambda_1 t} + A_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (21.43)$$

где $A_1 + A_2 = 1$ (так как $\Delta y/\Delta y_0 = 1$ при $t = 0$).

Уравнение (21.43) показывает, что двухступенчатому механизму, описываемому уравнением (21.29), соответствуют две экспоненциальные фазы. Относительный вклад этих фаз зависит от амплитудных параметров A_1 и A_2 , которые в свою очередь зависят от начальных условий (т.е. от того, в каком состоянии находится система исходно — полностью нативном, полностью денатурированном или каком-нибудь промежуточном). Действительно, из рис. 21.11,Б видно, что двухфазные графики, построенные в полулогарифмическом масштабе, различаются для прямого и обратного направлений процесса.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМПЛИТУДНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ РАЗГРАНИЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ

Как показано Икаи и Тэнфордом (А. Ikai, С. Tanford, 1971), A_1 и A_2 можно выразить через константы скорости и физические параметры. При сравнении этих амплитудных параметров с данными, приведенными на рис. 21.11, становится ясно, что простая схема (21.29) не может быть приведена в соответствие с наблюдаемыми значениями A_1 и A_2 . Это обстоятельство чрезвычайно важно, так как даже в тех случаях, когда двухфазные кинетики сами по себе согласуются со схемой (21.29), описывающей механизм с одним промежуточным состоянием, значения амплитудных параметров различных кинетических фаз могут ей противоречить, и, таким образом, этот механизм должен быть отвергнут.

Схема, которая лучше соответствует наблюдаемым амплитудным параметрам, выглядит следующим образом:



где X — неправильно свернутая форма. Оказывается, что для этой схемы все значения A_i положительны независимо от направления процесса. Это находится в соответствии с экспериментальными данными. На самом деле амплитудные параметры в случае цитохрома с лучше всего согласуются с механизмом, предполагающим образование и промежуточного состояния, и неправильно свернутой формы:



Этой схеме должны были бы соответствовать трехфазные кинетики, но на самом деле наблюдаются двухфазные, так как два из параметров λ_i очень близки.

Все изложенное показывает, с какой осторожностью следует проводить кинетический анализ, чтобы не совершить серьезных ошибок. Во избежание неправильной интерпретации результатов необходимо особенно тщательно проверять амплитуды и скорости кинетических процессов. Если же кинетический анализ проведен правильно, он может дать очень важную информацию о механизме процесса, которую трудно получить другими методами.

21.6. Репортерские группы (зонды)

Результаты исследования физических свойств белковых молекул в целом ничего не говорят о поведении отдельных участков молекул при их укладке. Чтобы получить такую информацию, к определенным участкам макромолекул присоединяют так называемые репортерские группы. Репортерская группа обладает особым физическим свойством (например, имеет характерный спектр поглощения), отличным от соответствующего свойства самого белка, и может изучаться отдельно от белковой молекулы в целом. Это позволяет следить за изменениями физических свойств в месте расположения репортерской группы. Необходимой предпосылкой таких исследований является предположение, состоящее в том, что репортерская группа не вносит значительных искажений в структуру макромолекулы. Правильность этого предположения можно проверить, например, путем сравнения процессов сворачивания — разворачивания самого белка и его производной, если следить за этими процессами по изменению физических свойств молекулы в целом.

ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ С ПОМОЩЬЮ РЕПОРТЕРСКИХ ГРУПП

Рассмотрим применение этого подхода на примере рибонуклеазы А. За разворачиванием этого белка, как уже упоминалось, можно следить по изменению поглощения в области 287 нм. Кинетические исследования процесса разворачивания выявили две стадии — одна из них имеет характерное время порядка миллисекунд, а другая, гораздо более медленная, — от 10 до 100 секунд. Это наблюдение весьма интересно, так как равновесные данные, рассмотренные нами в разд. 21.4, указывают на то, что переход для рибонуклеазы осуществляется по принципу двух состояний и, таким образом, должен был бы состоять только из одного этапа. Интересно выяснить, являются ли равновесные и кинетические изменения, наблюдаемые при 287 нм, отражением изменений, происходящих в каком-то определенном участке макромолекулы, или они связаны с шестью остатками тирозина (являющимися внутренними зондами), которые поглощают в этой области.

Чтобы ответить на этот вопрос, в качестве репортерской группы использовали динитрофенил (ДНФ) (рис. 21.12), который был избирательно присоединен к ε -аминогруппе остатка Lys⁴¹. За поглощением ДНФ можно наблюдать при длине волны 358 нм, достаточно далекой от λ_{max} полос поглощения белка.

На рис. 21.13. приведены кривые изменения поглощения при 286,5 и 358 нм для pH 1,3 в зависимости от температуры. Обе кривые указывают на наличие обратимого перехода при 30° С. В пределах ошибки эксперимента температуры полупереходов совпадают. Это означает, что конформационные изменения репортерской группы и остатков тирозина происходят параллельно.

Дальнейшие исследования, проведенные кинетическим методом, показали, что обе кинетические стадии, быструю и медленную, можно наблюдать, следя за изменением поглощения и ДНФ, и остатков тирозина. На рис. 21.14 приведены кривые изменения поглощения, соответствующие быстрым стадиям, полученные с помощью метода температурного скачка; температуру раствора скачкообразно изменяли от 35 до 40° С за 10 мкс. Осциллограф регистрировал изменение поглощения света в зависимости от времени при $\lambda = 286,5$ и 358 нм. Константы скорости этих экспоненциально затухающих процессов оказались одинаковыми. Более того, было обнаружено, что обе стадии — быстрая и медленная, наблюдаемые по изменению поглощения при 286,5 нм, сходны в ДНФ-со-

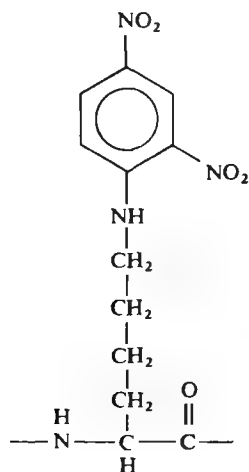


РИС. 21.12. Динитрофенильная группа (ДНФ), связанная с ε -аминогруппой лизина.

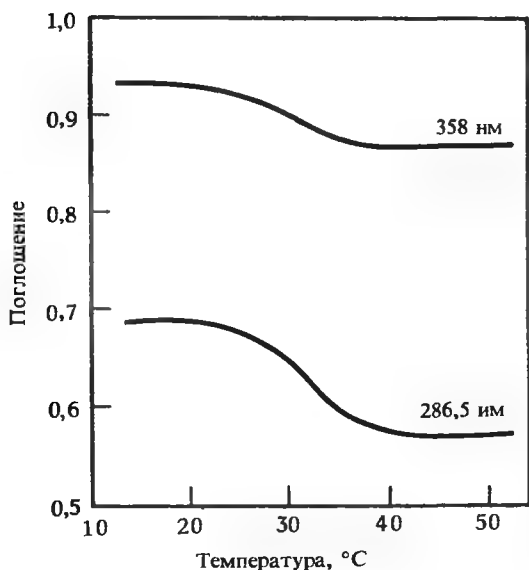


РИС. 21.13. Тепловая денатурация 41-ДНФ-рибонуклеазы при pH 1,3, наблюдаемая по поглощению при 286,5 и 358 нм. (Tsong T. Y., Baldwin R. L., J. Mol. Biol., **69**, 149, 1972.)

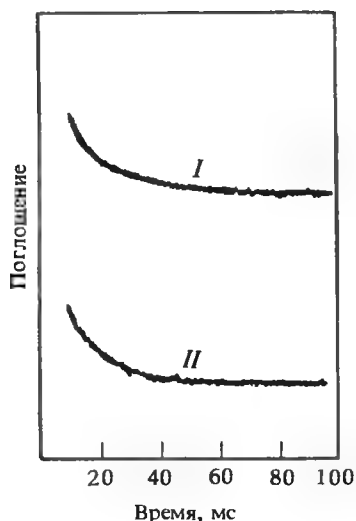


РИС. 21.14. Осциллограммы, полученные с помощью метода температурного скачка. Приведена зависимость поглощения 41-ДНФ-рибонуклеазы от времени после резкого увеличения температуры от 35 до 40°C при pH 1,3. I и II — изменение поглощения при длине волны 286,5 и 358 нм соответственно. Для большей ясности кривые смещены друг относительно друга. (Tsong T. Y., Baldwin R. L., J. Mol. Biol., **69**, 149, 1972.)

державшей и в немодифицированной рибонуклеазе. Это означает, что модификация не искажает структуры белка. Таким образом, и кинетические, и равновесные данные свидетельствуют о том, что изменения в молекуле в целом происходят согласованно с изменениями в любом отдельном месте молекулы.

21.7. Интерпретация двухфазных кинетических кривых ренатурации

Дальнейшие исследования Болдуина (R. L. Baldwin) и др. позволили установить, что двухфазность кинетики ренатурации рибонуклеазы обусловлена наличием двух денатури-

рованных состояний, U_1 и U_2 , которые ренатурируют с разными скоростями. Оба эти состояния сохраняются, если поместить рибонуклеазу в раствор с высокой концентрацией гуанидингидрохлорида; это свидетельствует о том, что они являются полностью денатурированными. Кинетические данные находятся в количественном согласии со следующей схемой:



где N — нативная форма. Согласно этой схеме, U_1 медленно превращается в другое денатурированное состояние, U_2 , и далее происходит быстрый переход с образованием нативной структуры. Хотя и U_1 , и U_2 — денатурированные цепи, можно предположить, что из U_2 легче формируются упорядоченные структуры, которые затем складываются в нативную конформацию.

Данные, полученные недавно Шмидом и Болдуином (F. X. Schmid, R. L. Baldwin, 1978), свидетельствуют о том, что медленный переход обусловлен *цис-транс*-изомеризацией имидных связей пролина. Полагают, что для формирования нативной структуры по крайней мере два из четырех остатков пролина рибонуклеазы A должны находиться в *транс*-положении. Один или оба других остатка могут встраиваться в структуру и в *цис*-, и в *транс*-положениях. Возможно, в процессе перехода $U_1 \rightarrow U_2$ одновременно с изомеризацией имидной связи происходит некоторое предварительное складывание молекулы. Другие данные по *цис-транс*-изомеризации пролина в процессе ренатурации белка были получены Лином и Брандсом (L. N. Lin, J. F. Brandts, 1978).

21.8. Исследования методом ЯМР

Наиболее эффективным методом исследования структурных перестроек был бы метод, который позволяет следить сразу за несколькими специфическими участками белковой молекулы в ходе формирования структуры и ее денатурации. С помощью такого метода мы могли бы прямо проверить справедливость различных механизмов сворачивания белка (см. рис. 21.6.). Например, наблюдая одновременно за несколькими участками макромолекулы в процессе ренатурации, мы легко могли бы отличить согласованные переходы от несогласованных. Кроме того, можно было бы прямо проверить возможность последовательного формирования структуры начиная с N-конца. Эта возможность представляется весьма интересной, так как *in vivo* полипептиды синтезируются начиная с N-конца по направлению к С-концу, и, если образование нативной структуры происходит в процессе синтеза, можно ожидать, что она формируется последовательно начиная с N-конца.

Один из методов, позволяющих наблюдать сразу за несколькими участками молекулы, основан на присоединении к этим участкам зондов (например, флуоресцентных или спиновых меток). Однако, как правило, присоединение зондов к более чем одному участку является весьма трудной задачей. Кроме того, всегда остается опасность, что зонд исказит структуру и полученные результаты не будут соответствовать реальной ситуации в нативном белке. Одновременное присоединение нескольких зондов только усугубляет эту проблему.

Весьма заманчиво было бы найти такой метод, который позволяет прямо наблюдать за изменениями в окружении отдельных участков белковой молекулы без включения в нее дополнительных групп. Таким методом является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР); используя ЯМР-спектрометры высокого разрешения (с рабочей частотой около 220 МГц и выше), можно наблюдать в спектре ЯМР линии, соответствующие отдельным аминокислотным остаткам, причем параметры этих линий весьма чувствительны к локальному окружению остатков. На самом деле в настоящее время ЯМР — это единственный метод исследования растворов, обладающий достаточно высокой разрешающей способностью и чувствительностью (обсуждение метода ЯМР см. в гл. 9).

ЯМР ЛИЗОЦИМА В ОБЛАСТИ ПЕРЕХОДА

Детальный анализ спектров ЯМР, снятых при 220 МГц в процессе тепловой денатурации, был проведен для лизоцима. На рис. 21.15 представлены эти спектры для D_2O (pD 5) при 35, 65 и 80° С (в качестве растворителя использовалась D_2O , а не H_2O , так как спектры H_2O и белка частично перекрываются). Слева приведены участки спектров, расположенные в слабопольной области, справа — в области сильных полей. Линии резонансного поглощения протонов NH-групп, обычно расположенные в интервале 6—11 м. д., отсутствуют, так как протоны заменены атомами дейтерия. Спектр в области от 3 до 6 м. д. не показан, поскольку он сильно «загрязнен» линиями от HDO.

В этих спектрах представлены в основном линии, отвечающие протонам СН-групп. Спектр денатурированной формы (при 80° С) близок к сумме спектров отдельных аминокислот. Например, химический сдвиг линий, отвечающих всем двенадцати метильным группам остатков аланина, равен 1,41 м. д. (~ 310 Гц), хотя в первичной структуре эти группы имеют разную локализацию. Линии от протонов других СН-групп расположены в области 200 — 450 Гц для алифатических аминокислот и 1500 — 1700 Гц для СН-групп триптофана, тирозина, фенилаланина и гистидина, связанных с ароматическим кольцом.

Спектр нативной формы (от 35 до 65° С) существенно отличается от спектра денатурированных молекул. Особенно заметно появление новых линий между 100 и — 200 Гц. Они принадлежат, по-видимому, протонам метильных групп, расположенным близко к пло-

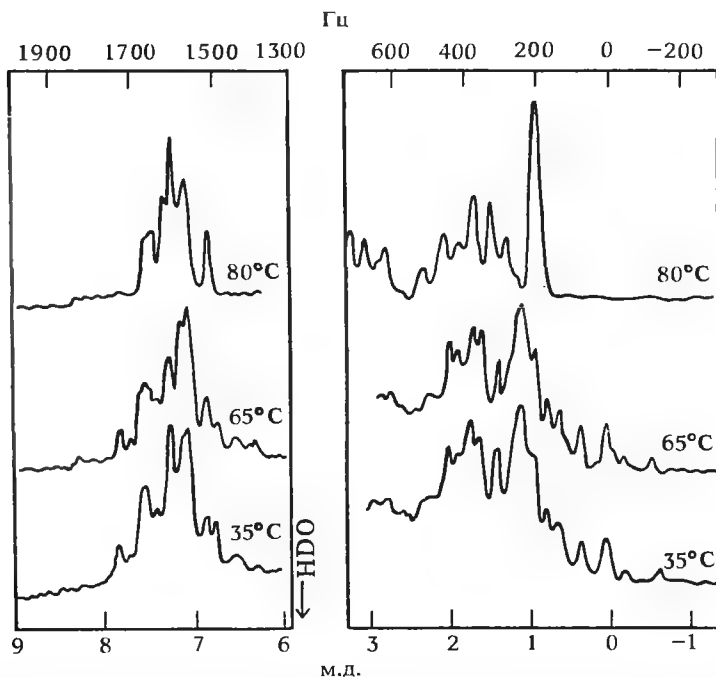


РИС. 21.15. Температурная зависимость спектра ЯМР лизоцима в D_2O , полученного при рабочей частоте 220 МГц при pD 5,0. Предварительно проведен обмен протонов NH-групп. Увеличение в слабопольной области больше, чем в области сильных полей. Значения химического сдвига даны относительно ДСС (см. гл. 9). (McDonald C. C. et al., J. Am. Chem. Soc., **93**, 235, 1971.)

скости ароматических колец, в результате чего под влиянием кольцевых токов (см. гл. 9) их линии сдвигаются в сторону сильных полей. Некоторые из этих линий были предположительно отнесены к определенным остаткам, расположенным в разных местах молекулы. Поскольку положение этих линий очень чувствительно к кольцевым токам расположенных поблизости групп, соответствующие остатки являются великолепными зондами, позволяющими исследовать структурные изменения в различных участках макромолекулы. Оценки показали, что заметный сдвиг линии может наблюдаться при смещении одного из этих остатков всего на несколько сотых долей ангстрема.

Из рис. 21.15 видно, что спектры нативных молекул, полученные при температурах 35 и 65° С, очень близки. Это наблюдение наводит на мысль, что нативное состояние есть единая уникальная структура, а не семейство быстро переходящих друг в друга форм, что привело бы к изменению химического сдвига с увеличением температуры.

При условиях, в которых проводился эксперимент, фермент денатурирует при температуре выше 65° С. Представляет интерес следующий вопрос: не указывают ли сопровождающие денатурацию изменения спектра ЯМР на какой-либо конкретный механизм этого процесса? На рис. 21.16. приведены спектры ЯМР в области сильных полей при температурах от 64 до 77° С. Спектр, снятый в момент перехода, представляет собой суперпозицию спектров нативной и денатурированной форм. Новые линии, которые могли бы указывать на существование промежуточных состояний, отсутствуют. Более того, линии, характерные для денатурированного состояния, появляются одновременно, как бы согласованно. Так же согласованно исчезают и «нативные» пики. Эти результаты свидетельствуют о реализации высококооперативного механизма двух состояний.

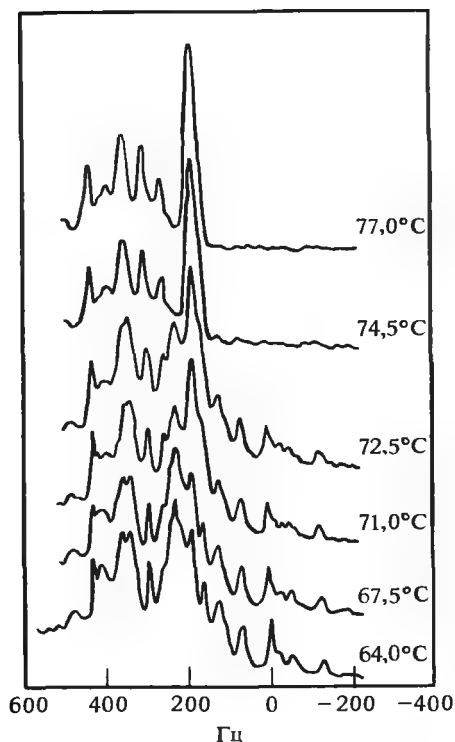


РИС. 21.16. Температурная зависимость спектра ЯМР лизоцима в области сильных полей в D_2O при рD 5,0. Значения химического сдвига даны относительно ДСС. (McDonald C. C. et al., J. Am. Chem. Soc., 93, 235, 1971.)

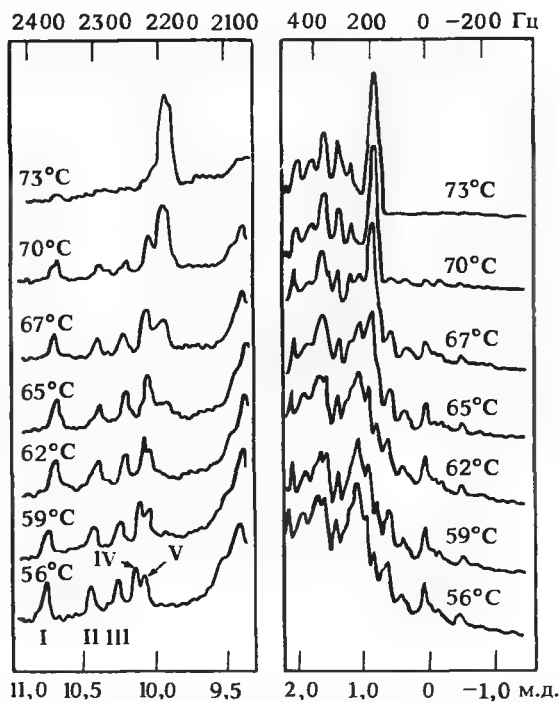


РИС. 21.17. Температурная зависимость спектра ЯМР лизоцима в H_2O при pH 3,3. Значения химического сдвига даны относительно ДСС. (McDonald C. C. et al., J. Am. Chem. Soc., 93, 235, 1971.)

Были сняты также спектры ЯМР водных растворов белка при кислых pH (pH 3,3). Эта методика позволяет достичь хорошего разрешения линий, отвечающих протонам NH-групп индола. При таких pH обмен атомов водорода этих групп с H_2O происходит достаточно медленно, чтобы можно было четко зарегистрировать соответствующие линии. На рис. 21.17 приведены спектры ЯМР в области как слабых, так и сильных полей, снятые при температурах от 56 до 73° С. Спектры, полученные при 73° С, характерны для денатурированного состояния; всем шести остаткам триптофана отвечает единственный пик при 2190 Гц. В ходе ренатурации происходит расщепление этой линии на шесть линий единичной интенсивности. На рис. 21.17 видны пять линий, расположенных в области 2200 — 2400 Гц, а шестая линия, очевидно, сдвинута в область, где расположены линии от протонов амидных групп (примерно от 1700 до 2140 Гц). Это расщепление отражает неэквивалентность окружения индольных групп в нативной структуре.

И опять, как и в опыте, рассмотренном выше, в момент перехода обе части спектра — в области слабых и в области сильных полей — представляют собой суперпозицию спектров нативного и денатурированного состояний, что еще раз свидетельствует о реализации механизма двух состояний для лизоцима.

ЯМР ГИСТИДИНОВЫХ ОСТАТКОВ РИБОНУКЛЕАЗЫ ПРИ pH 1,3

Методом ЯМР с фурье-преобразованием при 100 МГц была исследована температурная зависимость параметров линий, отвечающих C-2-протонам имидазольных групп четырех гистидиновых остатков рибонуклеазы. В этом эксперименте измеря-

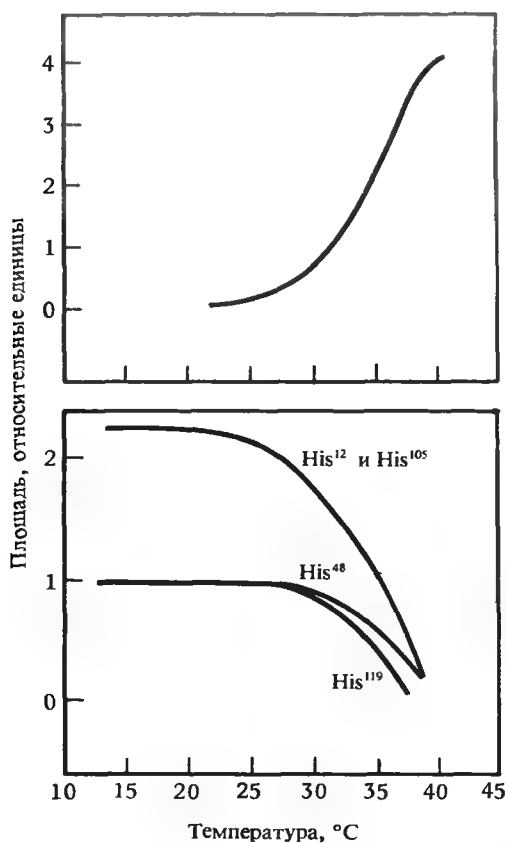


РИС. 21.18. Зависимость площади пиков для С-2-протонов имидазольных групп гистидиновых остатков от температуры. А. Изменение площади для гистидиновых остатков в денатурированной молекуле. Б. Изменение площади пиков, отвечающих указанным гистидиновым остаткам, в составе нативной молекулы. (Westmoreland D. G., Matthews C. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 914, 1973.)

лась площадь пиков для всех четырех гистидинов. При денатурации белка эти пики исчезают и появляется один новый пик, который соответствует С-2-протонам гистидиновых остатков денатурированных молекул. Достаточно точно измеряя площади пиков (пропорциональные концентрации протонов), мы можем получить картину разворачивания отдельных участков цепи.

На рис. 21.18 представлены данные такого рода. Из верхнего графика видно, что площадь пика, присутствующего в спектре денатурированной формы, плавно возрастает с увеличением температуры. Однако пики, соответствующие С-2-протонам имидазольных групп в нативной молекуле, меняются не согласованно. Особенно хорошо видно, что в окрестности His¹¹⁹ денатурация происходит при более низкой температуре, чем в окрестности His⁴⁸. Эти и другие данные относительно изменения химических сдвигов наводят на мысль, что денатурация не является простым процессом, включающим лишь два состояния. В то же время различие между ним и наблюдаемым процессом может быть связано лишь с небольшими структурными флуктуациями. Как бы то ни было, приведенные результаты иллюстрируют возможности метода ЯМР при получении детальной информации, помогающей решить эту сложную проблему.

21.9. Состояние исследований по сворачиванию белковых молекул

В этой главе мы обсудили в основном некоторые физико-химические подходы к изучению обратимого равновесного процесса сворачивания — разворачивания белков. Особенно важен вопрос о существовании промежуточных состояний и способов их экспериментального выявления. (Существование промежуточных состояний в процессах реокисления и ренатурации восстановленных белков обсуждается также в Дополнении 21.2.) Теперь имеет смысл обобщить имеющиеся данные о процессе сворачивания — разворачивания и те предположения, которые можно высказать по этому вопросу.

Дополнение 21.2

РЕОКИСЛЕНИЕ И РЕНАТУРАЦИЯ ВОССТАНОВЛЕННЫХ БЕЛКОВ

Механизм формирования нативных молекул из денатурированных можно исследовать при помощи белков с восстановленными дисульфидными связями. Реокисление таких белков сопровождается их ренатурацией, и на стадиях, соответствующих частичному окислению, могут быть обнаружены промежуточные формы. Для этого останавливают реакцию в соответствующий момент времени, когда успевает образоваться какая-то часть дисульфидных связей, и обрабатывают белок одной или несколькими протеазами, с тем чтобы выделить фрагменты, содержащие S—S-связи. Полученные пептиды можно сравнить с пептидами, выделенными подобным же образом из нативного белка.

Была детально исследована (R. R. Hantgan, G. G. Hammes, H. A. Scheraga, 1974) ренатурация восстановленной рибонуклеазы быка, которая в нативном состоянии имеет четыре дисульфидные связи. Реокисление производилось в смеси восстановленного и окисленного глутатиона. С помощью картирования пептидов было показано, что образуется множество промежуточных форм с неправильными, перепутанными дисульфидными связями. Затем система связей медленно перестраивается, и в результате образуется нативная структура. Ристоу и Ветлауфер (S. S. Ristow, D. B. Wetlaufer, 1973) провели подобные исследования на лизоциме. Оказалось, что и в этом случае могут формироваться системы дисульфидных связей, отличные от нативных, хотя, возможно, и не все перестановки разрешены.

Крейтон (T. E. Creighton, 1974) провел весьма тщательный анализ ренатурации восстановленного ингибитора трипсина быка — низкомолекулярного белка, состоящего из 58 аминокислот и содержащего три дисульфидные связи. Ренатурация ускорялась окисленными дисульфидными соединениями, такими, как окисленный дитиотрейтол и гидроксизтилдисульфид, которые стимулировали реакции дисульфидного обмена. Были выявлены и охарактеризованы промежуточные состояния с одной дисульфидной связью. Таких состояний оказалось четыре. У одного из них, наиболее часто встречающегося и составляющего половину от общего числа молекул с одной дисульфидной связью, последняя оказалась такой же, как у нативной молекулы. Предполагается, что соотношение между этими четырьмя типами структур отражает равновесное распределение промежуточных состояний на стадии образования одной дисульфидной связи. Преобладание молекул с такой же связью, как в нативной форме, наводит на мысль, что элементы нативной структуры, наиболее стабильные с термодинамической точки зрения, отбираются уже на ранних стадиях процесса сворачивания молекулы.

Можно ли использовать эти результаты при рассмотрении вопросов ренатурации белков из денатурированного состояния в нативное? Прежде всего, *реокисление и ренатурация восстановленных денатурированных белков* значительно отличается от ренатурации таких денатурированных белков, у которых все дисульфидные связи уже сформированы, причем «правильным» образом. Исследования промежуточных состояний с дисульфидными связями показывают, что в процессе окисления формируется много различных видов молекул, причем их относительное количество определяется термодинамической стабильностью. После того как правильный набор дисульфидных связей сфор-

мирован, белок должен «перебрать» целый ряд конформаций, с тем чтобы найти нативную структуру. Например, из рассуждения, приведенного в тексте, ясно, что белковые молекулы, у которых система дисульфидных связей не нарушена, могут принимать различные денатурированные конформации и что ренатурация таких молекул в нативное состояние требует определенного времени. Есть данные, что *in vivo* в ферментах происходит перестройка системы дисульфидных связей (Erstein et al., 1963). По-видимому, такая перестройка осуществляется достаточно быстро, и только после того, как установится правильный набор связей, начинается укладка молекулы с образованием нативной структуры.

Установить однозначно, существуют ли состояния молекул, отличные от нативного и денатурированного, часто бывает весьма трудно, но все же, правильно подобрав методы исследования и систему, эту задачу можно решить. Мы уже обсуждали случаи, когда с помощью кинетических измерений и метода ЯМР удавалось обнаружить наличие более чем двух состояний. Для рибонуклеазы было показано, что процесс ренатурации состоит из двух стадий: быстрой и медленной. Возникает вопрос: не переходят ли некоторые типы денатурированных молекул в ходе быстрой стадии в состояние, в котором у них имеются упорядоченные участки, служащие центрами нуклеации при ренатурации? В этом отношении представляют интерес данные, полученные Анфиисеном и др. при исследовании стафилококковой нуклеазы (149 остатков; см. Sachs et al., 1972). Используя иммунологический подход, они обнаружили, что изолированный фрагмент фермента (51 остаток) может принимать конформацию, похожую на ту, которую этот же фрагмент имеет в составе интактной молекулы. Интерпретация этих данных показала, что изолированный участок может переходить в конформацию N' , подобную нативной; переход в эту конформацию характеризуется константой равновесия $(N')/(U)$ (где U — конформации статистического клубка), примерно равной 10^{-4} . Это в свою очередь позволяет предположить, что некоторые типы денатурированных молекул легко переходят в состояния, в которых у них имеются упорядоченные участки с теми же конформациями, что и в нативной структуре.

Возникает вопрос: откуда берутся в денатурированной форме элементы упорядоченных структур? Скорее всего такие элементы α -спиралей и β -слоев образуются в разупорядоченной цепи флуктуационно. В этой связи представляют интерес эксперименты по ультразвуковой релаксации (G. Hammes, P. Roberts, 1969) для выяснения динамики перехода спираль — клубок в поли-L-орнитине. Измерения показали, что время релаксации перехода составляет примерно 10^{-8} с. Это означает, что скорость формирования и разрушения спирали на несколько порядков выше, чем наблюдаемая скорость процесса сворачивания — разворачивания белков в целом. Таким образом, денатурированные молекулы могут находиться в состоянии динамического равновесия с набором молекул, среди которых есть такие, которые содержат спиральные участки. Эти участки в свою очередь могут служить центрами нуклеации при ренатурации белка.

Структура, построенная на основе легко формирующихся центров нуклеации, может не соответствовать глобальному минимуму свободной энергии. Такая ситуация может иметь место, например, если структура, обладающая самой низкой свободной энергией, кинетически «недоступна», т.е. легко формирующиеся центры нуклеации не приводят к образованию конформации, соответствующей глобальному минимуму свободной энергии, а время, необходимое для достижения такого минимума, оказывается слишком большим для биологических систем. Эти соображения были высказаны Левинталем (C. Levinthal, 1968) и рассмотрены затем Ветлауфером и Ристой (D. B. Wetlaufer, S. Ristow, 1973).

На самом деле, однако, большинство экспериментальных результатов легко объясняется в предположении, что нативная структура является термодинамически наиболее предпочтительной.

Мы кратко рассмотрели некоторые из современных идей и представлений о процессе формирования структуры белка. Ясно, что для построения детальной картины этого процесса имеющихся данных недостаточно. Дальнейшие исследования в этом направлении потребуют как усовершенствования существующих методов, так и развития совершенно новых подходов.

Краткие выводы

Изучение процесса сворачивания — разворачивания белков позволяет понять, какие факторы определяют формирование нативной структуры этих молекул. Обратимая денатурация белков обычно является кооперативным процессом. Результаты многих термодинамических экспериментов можно объяснить в рамках модели двух состояний, где в качестве одного состояния выступает нативная структура, а другого — набор статистических клубков, известный как денатурированная форма. Для более глубокого проникновения в механизм формирования белка и процесса перехода (нативная структура) — (денатурированное состояние) применялись различные физические методы. Расхождения в результатах, полученных разными методами, можно объяснить образованием стабильных промежуточных состояний в процессе формирования структуры белка. Весьма полезным подходом является сравнение калориметрически измеренной полной энтальпии денатурации с энтальпией, полученной с помощью соотношения Вант-Гоффа по результатам измерения физических параметров (например, поглощения света) в процессе тепловой денатурации. При наличии промежуточных состояний первая величина будет больше второй.

Одним из наиболее эффективных методов изучения процесса сворачивания белков является кинетический анализ. Если кинетика процесса состоит более чем из одной стадии, значит, в процессе участвуют не два состояния, а больше. Для наблюдения и сравнения конформационных перестроек в различных участках макромолекулы, а также для выявления согласованности локальных структурных изменений особенно информативным является подход, основанный на специфическом присоединении к белковой молекуле «репортерских групп». Очень ценным является также метод ЯМР, позволяющий следить за протонами некоторых остатков, например C-2-протонами гистидина.

Наши представления о механизме формирования структуры белков весьма неполны. Одни данные согласуются с простой моделью двух состояний, другие показывают, что (по крайней мере в некоторых системах) можно предположить существование большего числа состояний. Представляется весьма правдоподобным, что сначала быстро формируются центры нуклеации, состоящие из α -спиральных участков и (или) β -слоев, эти центры затем служат как бы фундаментом, на котором строится вся структура.

Задачи

21.1. Выведите формулу для $\Delta H_{\text{каж}}$ [см. (21.17)] в случае белков, которые денатурируют с образованием промежуточного состояния.

21.2. Предположим, что денатурация белка происходит согласно механизму $N \rightleftharpoons X \rightleftharpoons D$. Вы измеряете две физические величины в три разных момента времени в процессе денатурации, для которых истинное значение f_D равно 0,2; 0,5 и 0,8, а соответствующее значение

$K = f_X/f_D$ равно 1,0; 0,4 и 0,125. Для одной физической величины $d_1 = 0,1$, для другой $d_1 = 0,2$. Можно ли таким образом выявить промежуточные состояния? (Ошибку эксперимента при измерении физических величин в каждом опыте считайте равной 5%.)

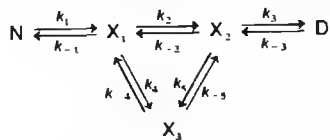
21.3. Предположим, что зависимость ΔG от температуры при денатурации белка описывается уравнением

$$\Delta G = a + bT + cT^2$$

где a , b и c — константы. Найдите зависимость ΔH , ΔS и ΔC_p от a , b , c и T . Существует ли для этого белка температура, при которой его стабильность максимальна? Если да, то чему равна эта температура в градусах Цельсия при $a = 100 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1}$, $b = 1200 \text{ кал} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$, $c = -2 \text{ кал} \cdot \text{К}^{-2} \cdot \text{моль}^{-1}$?

21.4. Кинетику процесса сворачивания — разворачивания белка изучают при различных условиях с помощью метода, основанного на присоединении к белковой молекуле в качестве репортерской группы хромофора, который поглощает свет в видимой области при длине волны, достаточно далекой от полосы поглощения самого белка. Если наблюдать за поглощением ароматических групп белка при длине волны 280 нм, то кинетики сворачивания и разворачивания представляются строго однофазными. Если, однако, одновременно следить за поглощением репортерской группы в видимой области, кинетики обоих процессов кажутся двухфазными. Контрольный эксперимент, проведенный с молекулами, не имеющими репортерских групп, показал, что наблюдаемая при 280 нм кинетика процесса не отличается от таковой для молекул, содержащих присоединенный хромофор. «Все эти данные говорят о том, что исследуемые процессы протекают согласно схеме $N \rightleftharpoons D$ и что репортерская группа искажает структуру», — заявляет осторожный студент. Его очень самоуверенный однокурсник говорит: «На этот раз твоя интерпретация результатов, по-видимому, верна, хотя по крайней мере один момент ты упустил». Кто из них прав и почему? Если вы считаете, что неправы оба, обоснуйте свои соображения. Если вы согласны с самоуверенным студентом, то объясните слабое место интерпретации. Какие еще данные было бы полезно иметь?

21.5. Предположим, что процесс сворачивания — разворачивания белка протекает согласно механизму



Каково минимальное число кинетических уравнений, необходимое для описания кинетики этой системы с помощью величин Δf_N , Δf_{X_1} , Δf_{X_2} и Δf_D в качестве переменных? Сколько параметров λ_i будет в решении этих уравнений и почему? Предположим теперь, что все константы скорости реакций значительно больше, чем k_1 и k_{-1} . Кинетику какого процесса — $N \rightarrow D$ или $D \rightarrow N$ — лучше исследовать, чтобы обнаружить наличие нескольких стадий? Почему?

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Anfinsen C. B., Scheraga H. A.*, 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding, *Adv. Protein Chem.*, **29**, 205.
- Baldwin R. L.*, 1975. Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 453. [Ясное и содержательное краткое изложение; отличное пособие для начинающих.]
- Némethy G., Scheraga H. A.*, 1977. Protein folding, *Quart. Rev. Biophys.*, **10**, 239.
- Tanford C.*, 1968. Protein denaturation, part A: Characterization of the denatured state. Part B: The transition from native to denatured state, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121.
- Tanford C.*, 1970. Protein denaturation, part C: Theoretical models for the mechanism of denaturation, *Adv. Protein Chem.*, **24**, 1. [Эта серия статей всесторонне освещает методы, используемые при исследовании денатурации белков, и дает физико-химическое обоснование проблемы.]
- Wetlaufer D. B., Ristow S.*, 1973. Acquisition of three-dimensional structure of proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 135. [Авторы подчеркивают важность кинетических факторов, которые могут помешать достичь глобального минимума свободной энергии.]

Специальная

- Creighton T. E.*, 1974. Renaturation of the reduced bovine pancreatic trypsin inhibitor. Intermediates in the refolding of reduced pancreatic trypsin inhibitor. The single-disulphide intermediates in the refolding of reduced pancreatic trypsin inhibitor, *J. Mol. Biol.*, **87**, 563.
- Epstein H. J., Goldberger R. F., Anfinsen C. B.*, 1963. The genetic control of tertiary protein structure: Studies with model systems, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 439.
- Hammes G. G., Roberts P. B.*, 1969. Dynamics of the helix-coil transition in poly-L-ornithine, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1812.
- Hantgan R. R., Hammes G. G., Scheraga H. A.*, 1974. Pathways of folding of reduced bovine pancreatic ribonuclease, *Biochemistry*, **13**, 3421.
- Ikei A., Tanford C.*, 1971. Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins, *Nature*, **230**, 100.
- Kanehisa M. I., Tsong T. Y.*, 1978. Mechanisms of the multiphasic kinetics in the folding and unfolding of globular proteins, *J. Mol. Biol.*, **124**, 177.
- Karplus M., Weaver D. L.*, 1979. Diffusion-collision model for protein folding, *Biopolymers*, **18**, 1421.
- Levinthal C.*, 1968. Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.*, **65**, 44.
- Levitt M., Chothia C.*, 1976. Structural patterns in globular proteins, *Nature*, **261**, 552.
- Lin N.-L., Brandts J. F.*, 1978. Further evidence suggesting that the slow phase in protein unfolding and refolding is due to proline isomerization: A kinetic study of carp parvalbumins, *Biochemistry*, **17**, 4102.
- Ristow S. S., Wetlaufer D. B.*, 1973. Evidence for nucleation in the folding of reduced hen egg lysozyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 544.
- Sachs D. H., Schechter A. N., Eastlake A., Anfinsen C. B.*, 1972. An immunological approach to the conformational equilibria of polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3790.
- Schmid F. X., Baldwin R. L.*, 1978. Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: Evidence that the reaction is proline isomerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4764.

22.1. Исследования нуклеиновых кислот

Как ведут себя нуклеиновые кислоты в водных растворах? Какого типа упорядоченные структуры они образуют и как объяснить наблюдаемые физические и химические свойства на основании этих структур? Как происходит переход нуклеиновых кислот из одного состояния в другое? Этим вопросам посвящены данная и две следующие главы. Ясно, что без ответа на них нельзя до конца понять, как нуклеиновые кислоты выполняют важнейшую функцию хранения и передачи генетической информации. Основу для объяснения некоторых сложных особенностей поведения нуклеиновых кислот дают предыдущие главы. В гл. 3 рассмотрены структурные и химические аспекты. Гл. 6 посвящена силам, стабилизирующим конформации нуклеиновых кислот. В гл. 7—12 описаны в общих чертах те методы, которыми можно исследовать конформационные свойства биополимеров в растворе. Теперь мы подытожим всю эту информацию и проанализируем некоторые свойства природных нуклеиновых кислот и соответствующих модельных систем. При этом наше внимание будет сосредоточено на поведении их в растворе, поскольку это именно те условия, в которых нуклеиновые кислоты функционируют в клетке.

СРАВНЕНИЕ С ИССЛЕДОВАНИЯМИ БЕЛКОВ

Полезно сопоставить общие проблемы изучения конформационных состояний и их изменений для белков, рассмотренные в гл. 21, с аналогичными проблемами для нуклеиновых кислот.

Типичный белок по размеру значительно меньше типичной нуклеиновой кислоты. Молекулярная масса всех нуклеиновых кислот, за небольшим исключением, измеряется миллионами дальтон, а эффективность и простота использования большинства физических методов исследования значительно падают при увеличении молекулярной массы объекта.

Для большинства белков существуют простые и достаточно информативные биологические тесты, которые позволяют контролировать биологическую активность исследуемого препарата. Для нуклеиновых кислот таких тестов очень мало.

При изучении белков можно сосредоточить внимание на исследовании какого-то определенного участка белковой молекулы, используя для этого редко встречающиеся или обладающие специфической реакционной способностью боковые группы аминокислот, простетические группы или субстраты. Нуклеиновые кислоты почти не содержат остатков со специфической реакционной способностью или особыми физическими свойствами.

Структура и функции белков столь разнообразны, что дополнительную информацию о них можно извлечь, проводя сравнительные исследования; иногда это позволяет обойти трудности, кажущиеся на первый взгляд непреодолимыми, путем перехода на другую систему. Число же типов нуклеиновых кислот невелико; исключение составляют лишь мРНК, но, как правило, они присутствуют в клетке в слишком малых количествах (или очень трудно поддаются очистке), чтобы можно было проводить обычные исследования.

Большинство белков состоит из субъединиц. Часто эти субъединицы можно обратимым образом разделить и изучать их по отдельности, и по результатам этих исследований судить об исходной интактной структуре. Единственным случаем субъединичного

строения нуклеиновых кислот являются двухцепочечные полимеры, но изучение каждой из цепей по отдельности не всегда оказывается целесообразным.

Однако нуклеиновые кислоты как объекты физических исследований имеют несколько явных преимуществ перед белками. Поскольку у этих молекул обычно имеется только четыре типа мономерных звеньев (исключение составляют тРНК), спектр основных взаимодействий значительно уже, чем для белков. Как мы увидим дальше, большинство взаимодействий в высокомолекулярных нуклеиновых кислотах реализуется почти в такой же форме в очень небольших фрагментах нуклеиновых кислот — в ди- и олигонуклеотидах. Поэтому, исследуя такие небольшие фрагменты, удается получить достаточно общие результаты, которые позволяют судить о свойствах значительно более длинных полимеров. Напротив, короткие пептиды не могут служить адекватной моделью для белков и на самом деле их нельзя считать достаточно хорошими моделями даже для вторичной структуры полипептидов.

Для подавляющего большинства белков ответы на наиболее важные вопросы, связанные с их функционированием, можно получить лишь на уровне третичной структуры, в то время как большинство методов исследования белков в растворе недостаточно эффективны, чтобы с их помощью можно было получить необходимую информацию. Что же касается нуклеиновых кислот, то в настоящее время представляется, что многие аспекты их функционирования удастся выяснить на уровне вторичной структуры, хотя не исключено, что это мнение ошибочно и мы просто не представляем, какие трудности могут встретиться на этом пути. Не вызывает сомнений тот факт, что третичная структура некоторых нуклеиновых кислот, например тРНК, является столь же сложной и важной для функционирования этой молекулы, как и третичная структура белков. Но во многих других случаях нет необходимости рассматривать взаимодействия цепей на уровне третичной структуры, чтобы объяснить наблюдаемые свойства нуклеиновых кислот, и мы можем ограничиться значительно более простой задачей.

22.2. Структура и стабильность одноцепочечных нуклеиновых кислот

Известно, что двухцепочечные нуклеиновые кислоты образуют регулярные спиральные структуры, подобные уотсон-криковской В-форме ДНК. Но что произойдет, если удалить одну из двух цепей двойной спирали или если синтезировать гомополинуклеотид [например, poly(dA)], в котором не может происходить спаривание оснований, как в ДНК? Рассмотрим два крайних случая: одиночная цепь имеет клубкообразную структуру, довольно жесткую и протяженную из-за ограниченной свободы вращения в фосфодиэфирном остове (см. гл. 6); одиночная цепь образует регулярную спираль с тем же радиусом и шагом, как и в том случае, когда она образует двойную спираль вместе с комплементарной цепью.

Ни одно из этих предположений на самом деле не выполняется, но, как мы увидим ниже, второе из них оказывается ближе к реальности. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты представляют собой высокоупорядоченные структуры, содержащие спиральные участки, и их свойства сильно зависят от состава и последовательности оснований в цепи. Эта упорядоченность, однако, легко нарушается при изменении температуры, pH или растворителя. Хотя локальные свойства одноцепочечных нуклеиновых кислот не слишком чувствительны к ионной силе, глобальные свойства (такие, как гидродинамические характеристики) существенно меняются при изменении этого параметра, как и следует ожидать для любых полиэлектролитов с высокой плотностью зарядов, какими являются нуклеиновые кислоты.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО УПОРЯДОЧЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГОМОПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Взаимодействия, влияющие на оптические свойства системы одинаковых или сходных звеньев, очень сильно зависят от ориентации и расстояния между соседними звеньями. К таким взаимодействиям относится диполь-дипольное, ответственное за появление спектров КД и гипохромизм, и взаимодействие, связанное с кольцевыми токами, которое существенно для ЯМР. Реальная клубкообразная структура состоит из набора остатков, находящихся в самых разных взаимных ориентациях. Оптические свойства или спектры ЯМР случайного клубка близки к таковым для изолированных мономерных остатков¹, поскольку все взаимодействия в значительной степени компенсируют друг друга из-за усреднения по ориентациям. В самом деле, спектры поглощения и КД гомополинуклеотидов, таких, как poly(rA) и poly(rC) [обозначаемых также poly(A) и poly(C)], при температуре около 100° С очень близки к соответствующим спектрам мононуклеозидов или мононуклеотидов. При более низких температурах, однако, оптические свойства гомополинуклеотидов и мономеров сильно различаются. Спектры КД poly(rA), poly(rC) и их дезоксианалогов, а также большинства других нуклеиновых кислот с простыми последователь-

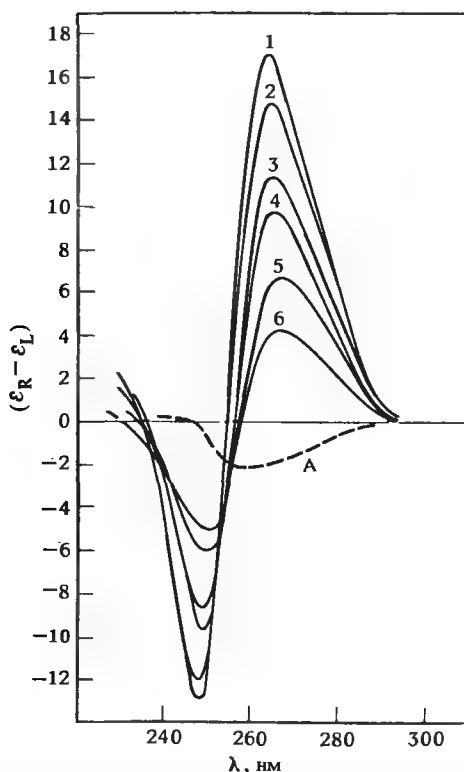


РИС. 22.1. Спектры кругового дихроизма poly(rA) при разных температурах. Данные получены для 0,1 М раствора NaCl (рН 7,4) при температурах от -2 до 6°С (кривая 1), 17°С (кривая 2), 34°С (кривая 3), 42°С (кривая 4), 57°С (кривая 5) и 70°С (кривая 6). Приведен также спектр КД мономера аденозина (при 0°С); этот спектр почти не зависит от температуры. (Ts'o P.O.P. In: Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, vol. 2, ed. P.O.P. Ts'o, New York, Academic Press, 1974.)

¹ В спектрах ЯМР клубка должно наблюдаться дипольное уширение линий из-за того, что большой жесткий клубок может совершать медленное беспорядочное движение, однако здесь мы пренебрежем этим эффектом.

Таблица 22.1

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ
И ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДОВ¹⁾

Вещество	Поглощение			Круговой дихроизм	
	λ_{max} , нм	$\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-4}$ на звено	гипохроизм при λ_{max}	λ_{max} , нм	$\theta(\lambda_{\text{max}}) \cdot 10^{-4}$ на звено
Аденозин (A)	259,2	1,49	0,00	263,5	-0,38
ApA	257,5	1,36	0,12	271	2,03
Poly(rA)	256,5	0,90	0,33	264	7,2
Цитидин (C)	271	0,91	0,00	272,5	1,04
CpC	270	0,83	0,07	280	3,08
Poly(rC)	269,5	0,62	0,31	278	7,4
Уридин (U)	261,5	1,01	0,00	267,5	0,92
UpU	261	0,98	0,02	271	1,61
Poly(rU)	260	0,92	0,08	267,5	1,50

¹⁾ I. Tinoco et al.

ностями являются при комнатной температуре более интенсивными, чем спектры соответствующих мономеров. Меняются знак, положение и число полос эллиптичности в ближней ультрафиолетовой области. Эти изменения в спектре для poly(rA) показаны на рис. 22.1. Из этих данных следует, что poly(rA) при нейтральных pH и комнатной температуре обладает некоторой упорядоченностью (см. гл. 8).

Однако получить представление о деталях структуры полимера с помощью одних только данных о спектрах КД довольно трудно. Консервативный характер двух самых ближних полос в УФ-области указывает на наличие экситонного расщепления. Это означает, что в среднем соседние основания в полимере имеют некоторую предпочтительную ориентацию. Без детального анализа спектра невозможно сказать, распространяется ли эта упорядоченность на весь полимер или носит лишь локальный характер. Чтобы провести такой анализ, необходимо, как правило, иметь более детальные гипотезы о характере структуры.

В табл. 22.1 приведены параметры спектров КД некоторых рибонуклеозидов, олигорибонуклеотидов и полирибонуклеотидов при комнатной температуре. Данные для poly(rC) и poly(rA) качественно сходны и являются довольно типичными. Исключение составляет poly(rU), оптическая активность которой мало отличается от таковой для составляющих ее мономеров. Из одного этого факта не следует, однако, что poly(rU) совершенно не упорядочена, поскольку спектры КД очень чувствительны к углу между соседними остатками. Можно представить себе ситуацию, когда упорядоченная структура обладает такой же оптической активностью, как и составляющие ее мономеры. Например, стопка параллельных хромофоров, расположенных наподобие зубьев расчески, не будет давать дополнительного вклада в спектр КД, если у хромофора имеется только один электронный переход в той области спектра, где проводятся измерения.

Спектры поглощения дают более четкие указания в пользу того, что большинство гомополинуклеотидов имеет конформацию, отличную от клубкообразной. Поглощение poly(rA), poly(rC) и многих других полинуклеотидов значительно меньше, чем у составляющих их мономеров (табл. 22.1), что свидетельствует о локальном стопкообразном расположении хромофоров. Poly(rU) составляет исключение из общего правила и в этом случае. Данные по гипохроизму для этого полимера подтверждают предположение, сле-

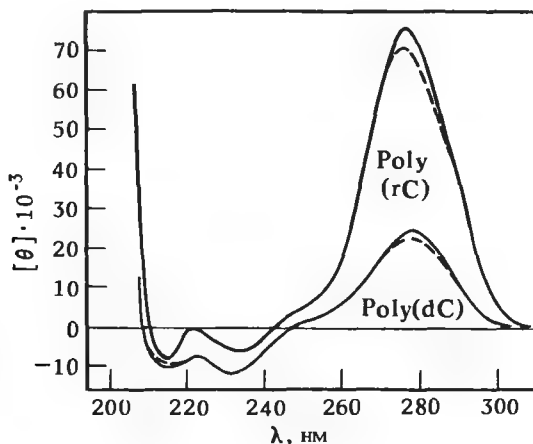


РИС. 22.2. Спектры кругового дихроизма poly(rC) и poly(dC) при pH 10,0. Сплошные кривые — 2М раствор NaCl, пунктирные — 10^{-4} М раствор NaCl. (Adler A. et al., Biochemistry, 7, 3836, 1968.)

ланное на основании спектров КД, что доля звеньев, входящих в состав локально упорядоченных участков, в poly(rU) весьма незначительна (или вообще равна нулю). Что же касается других полимеров, то и в этом случае трудно связать наблюдаемую степень гипохромизма с какими-либо деталями локальной структуры, кроме предпочтительного стэкинга. Ни одна из существующих теорий гипохромизма не позволяет достаточно точно предсказать размер локально упорядоченной области. Степень гипохромизма для poly(rA) и poly(rC), однако, значительно меньше, чем для двухцепочечных структур, подобных В-форме ДНК. Это служит указанием на то, что степень локальной упорядоченности в гомополимерах меньше, чем та, которую следует ожидать для жестких совершенных спиралей.

Конформация, принимаемая гомополинуклеотидами, определяется термодинамикой взаимодействий между мономерными звеньями и между мономерами и растворителем. Полидезоксирибонуклеотиды и полирибонуклеотиды различаются только присутствием или отсутствием 2'-гидроксильной группы в сахаре. Это различие, однако, оказывает глубокое влияние на предпочтительную конформацию рибозного кольца, которая в свою очередь влияет на статистические размеры одноцепочечных полинуклеотидов. Оно ответственно также за значительные различия в конформациях двойных спиралей, принимаемых комплементарными двухцепочечными РНК и ДНК. Поэтому не удивительно, что локальная структура различных гомополимеров, выявляемая при исследовании их оптических свойств, также зависит от наличия 2'-гидроксильной группы. Например, спектры КД poly(dC) и poly(rC) существенно различаются по интенсивности (рис. 22.2). Поскольку оптические свойства dC и rC почти одинаковы, можно быть совершенно уверенным, что эти спектральные различия связаны с различиями в структуре. Замена 2'-ОН- группы на 2'-ОМе приводит к образованию полимеров, весьма близких по своим свойствам к обычным полирибонуклеотидам.

ВЛИЯНИЕ СОЛИ НА ЛОКАЛЬНУЮ СТРУКТУРУ ОДИНОЧНЫХ ЦЕПЕЙ

Любой полимер с полностью упорядоченной структурой находится в состоянии, отвечающем глубокому минимуму свободной энергии. Обычно вполне допустимым является предположение, что небольшие изменения экспериментальных условий мало сказываются на таких свойствах, как КД. Самыми простыми из таких переменных, определяющих

внешние условия, для большинства полимеров являются рН, ионная сила, температура и растворитель. Особенно существенно для гомополимеров влияние растворителя. Практически любое органическое вещество, за исключением, пожалуй, сахарозы, добавленное в умеренных количествах, способствует разрушению упорядоченных форм. Влияние рН довольно сложно; мы обсудим его в разд. 22.3.

Оптические свойства одноцепочечных гомополинуклеотидов сравнительно нечувствительны к ионной силе в очень широком диапазоне, как это видно из рис. 22.2 для poly(rC). Структурные изменения наблюдаются лишь при очень высокой концентрации соли (> 1 М), но в этой области чувствительность к ионной силе не является простым отражением электростатических эффектов. При таких концентрациях соли настолько меняется структура воды, что следует говорить, вероятно, о влиянии изменения растворителя. Отсутствие эффекта при более низких ионных силах означает, что у всех локальных структур, характерных для такого полинуклеотида, как poly(rC), среднее расстояние между соседними фосфатами должно быть примерно одинаковым.

Электростатический потенциал Φ в точке $\mathbf{r}$ от совокупности z зарядов в среде без ионов равен в соответствии с законом Кулона

$$\Phi(\mathbf{r}) = \sum_{k=1}^z e/(\epsilon|\mathbf{r} - \mathbf{r}_k|) \quad (22.1)$$

где ϵ — диэлектрическая постоянная, e — заряд электрона, $\mathbf{r}_k$ — положение k -го заряда. Электростатическая свободная энергия может быть вычислена как работа, необходимая для переноса всех этих зарядов в их положения $\mathbf{r}_i$:

$$G_{эл} = \sum_{l=1}^z \int_0^e \Phi(\mathbf{r}_l) de \quad \text{для } l \neq k \quad (22.2)$$

Как видно из этого уравнения, для нахождения $G_{эл}$ нужно просуммировать работу, необходимую для переноса каждого заряда в соответствующую точку, в предположении, что все другие заряды уже находятся на своих местах.

Уравнение (22.1) не может быть использовано в случае заряженных полимеров в водной среде с присутствующим в ней электролитом из-за экранирующего действия противоположно заряженных ионов (рассмотренного в предыдущих главах). Вместо этого должен быть использован экранированный потенциал. Удобная приближенная формула для этого потенциала имеет вид

$$\Phi(\mathbf{r}) = \sum_{k=1}^z [e/(\epsilon|\mathbf{r} - \mathbf{r}_k|)] \exp(-\kappa|\mathbf{r} - \mathbf{r}_k|) \quad (22.3a)$$

где κ (параметр экранировки Дебая — Хюккеля) есть функция ионной силы I . Параметр κ является мерой дополнительного ослабления электростатического взаимодействия из-за присутствия противоположно заряженных ионов:

$$\kappa = (8\pi e^2/100\epsilon kT)^{1/2} I^{1/2} \quad (22.3b)$$

Ионная сила I связана с общей концентрацией заряженных частиц в растворе:

$$I = \sum_i C_i z_i^2/2 \quad (22.3b)$$

где C_i — молярная концентрация ионов i -го типа с зарядом z_i . Для электролита 1:1 (такого как NaCl) ионная сила равна молярной концентрации катионов или анионов.

Чтобы вычислить электростатическую свободную энергию полимера, нужно подставить соотношение (22.3а) в (22.2). Используя обозначение $r_{kl} = |r_l - r_k|$, получаем для электростатической свободной энергии полимеров типа $\text{poly}(\text{rA})$, в которых все мономерные единицы имеют одинаковый заряд:

$$G_{\text{эл}} = (e^2/2\varepsilon) \sum_{l=1}^z \sum_{k \neq l}^z [\exp(-\kappa r_{kl})]/r_{kl} \quad (22.4)$$

Это довольно грубое приближение. Здесь предполагается, что макроскопическая диэлектрическая постоянная одинакова во всех точках структуры. Открытым остается вопрос и о точности соотношения (22.3а). Из этого уравнения, однако можно сделать ряд простых выводов.

При комнатной температуре в водном буферном растворе κ равно $0,33^{1/2} \text{ \AA}^{-1}$. Таким образом, при ионной силе 0,1 М или выше κ велико, и все слагаемые в (22.4), за исключением тех, которые отвечают очень близким зарядам ($r_{kl} \rightarrow 0$), малы. При низкой ионной силе экспоненциальные члены в (22.4) стремятся к единице. При этом $G_{\text{эл}}$ не только становится очень большой величиной, но и начинает сильно зависеть от взаимодействия удаленных друг от друга зарядов из-за слабой зависимости потенциала от расстояния, соответствующей члену r_{kl}^{-1} .

Согласно уравнению (22.4), нечувствительность оптических свойств $\text{poly}(\text{C})^1$ к изменению ионной силы позволяет сделать несколько выводов. Вряд ли $\text{poly}(\text{C})$ образует многоцепочечные структуры, поскольку в этом случае расталкивание зарядов при низкой ионной силе будет столь велико, что цепи должны будут разойтись и изменить ионные характеристики. Маловероятно также, что $\text{poly}(\text{C})$ может образовывать какой-нибудь тип структуры, в которой удаленные вдоль цепи остатки оказываются очень близко друг к другу и вступают во взаимодействия, которые можно зарегистрировать оптическими методами. Однако отсутствие влияния ионной силы оставляет открытым вопрос о наличии в $\text{poly}(\text{C})$ какой-либо упорядоченности на малых расстояниях.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СВОЙСТВА ГОМОПОЛИМЕРОВ

Оптические свойства $\text{poly}(\text{A})$, $\text{poly}(\text{C})$ и большинства других гомополимеров сильно зависят от температуры (см. рис. 22.1). Во всей области температур, в которой обычно исследуются биологические молекулы (имеются в виду температуры, при которых возможна жизнь в известных нам формах), спектры КД и поглощения изменяются монотонно. Вблизи 100°C наблюдается насыщение, и оптические свойства приближаются к оптическим свойствам мономеров. Ясно, что в этом предельном случае конформация соответствует случайному клубку. При очень низких температурах (в большинстве случаев ниже 0°C) у температурной зависимости также обычно начинают появляться признаки насыщения. Плато в этой области соответствует максимальной достижимой упорядоченности, но оно ни в какой мере не означает, что образуется совершенная структура с протяженными упорядоченными областями.

При комнатной температуре $\text{poly}(\text{A})$ и другие гомополимеры находятся в состоянии, отвечающем середине структурного перехода от случайного клубка (высокая температура) к упорядоченной форме (низкая температура). Ширина этого температурного перехода

¹ Обозначения $\text{poly}(\text{C})$ и $\text{poly}(\text{rC})$ эквивалентны; если речь идет о дезокси-форме, то это всегда прямо указывается [т.е. пишется $\text{poly}(\text{dC})$]. Поэтому мы будем в явном виде указывать форму «рибо» только при сравнении рибо- и дезокси-форм в одном контексте.

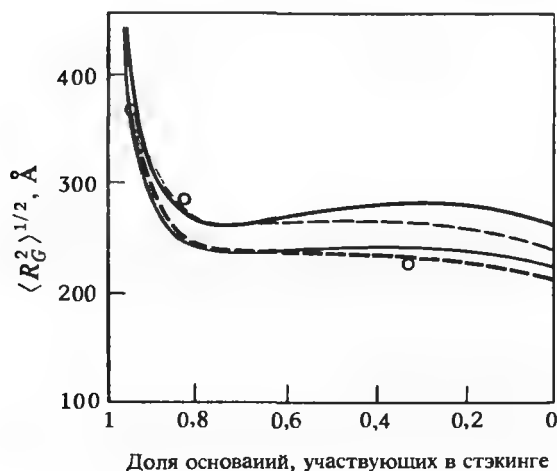


РИС. 22.3. Зависимость среднеквадратичного радиуса инерции $\text{poly}(\text{rA})$ от доли оснований, участвующих в стэкинге. Кружочки — экспериментально полученные значения для полимера со средней длиной цепи в 1740 звеньев, с поправкой на гетерогенность. Кривые соответствуют теоретической зависимости $\langle R_G^2 \rangle^{1/2}$ от стэкинга в цепи, полученной для четырех возможных наборов ограничений на торсионные углы для формы без стэкинга. (Inners L. D., Felsenfeld G., J. Mol. Biol., **50**, 373, 1970.)

да заставляет предположить, что кажущееся изменение энтальпии весьма мало по сравнению с типичными величинами для макромолекулярных конформационных изменений. Наблюдаемые спектры КД при изменении температуры образуют семейство очень близких по форме кривых, различающихся главным образом только по амплитуде. Это свидетельствует о том, что при каждой температуре существуют оба типа структур и может меняться лишь протяженность соответствующих участков.

Наиболее прямо указывают на то, что упорядоченные формы гомополинуклеотидов являются жесткими структурами, гидродинамические данные. На рис. 22.3 суммированы результаты, полученные Г. Фельзенфельдом и др. (G. Felsenfeld) при всесторонних исследованиях свойств $\text{poly}(\text{A})$. Оптическими методами была определена доля звеньев, участвующих в стэкинге, в зависимости от температуры. С помощью гидродинамических методов и светорассеяния была найдена температурная зависимость жесткости полимера. Радиус инерции, определенный по результатам этих измерений, менялся с температурой весьма незначительно, за исключением области очень низких температур, в которой достигалась почти максимальная степень упорядоченности. Объединяя оптические и гидродинамические данные, можно построить зависимость радиуса инерции от доли оснований, включенных в стопкообразные структуры (рис. 22.3). Заметное увеличение жесткости наблюдается только в той области, где доля стопкообразных структур близка к единице. Это связано с двумя эффектами. Клубкообразная форма полинуклеотидов уже является довольно протяженной и жесткой. Кроме того при не очень большой доле оснований, участвующих в стэкинге, упорядоченные области оказываются слишком короткими для того, чтобы заметно изменить суммарную конфигурацию цепи (см. гл. 6 и 19).

Радиус инерции $\text{poly}(\text{U})$ при комнатной температуре близок к наблюдаемому для $\text{poly}(\text{A})$ при высокой температуре, где почти отсутствует локальная упорядоченность. Этот факт является веским подтверждением того, что $\text{poly}(\text{U})$ образует упорядоченные структуры, типичные для других гомополимеров, только в растворах с высокой концентрацией соли при очень низкой температуре.

СПИРАЛИ С ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМ СТЭКИНГОМ

Никакие из рассмотренных выше данных не дают четких указаний на то, что гомополимеры образуют одноцепочечные структуры (рис. 22.4,А) при нейтральных рН. Будет поу-

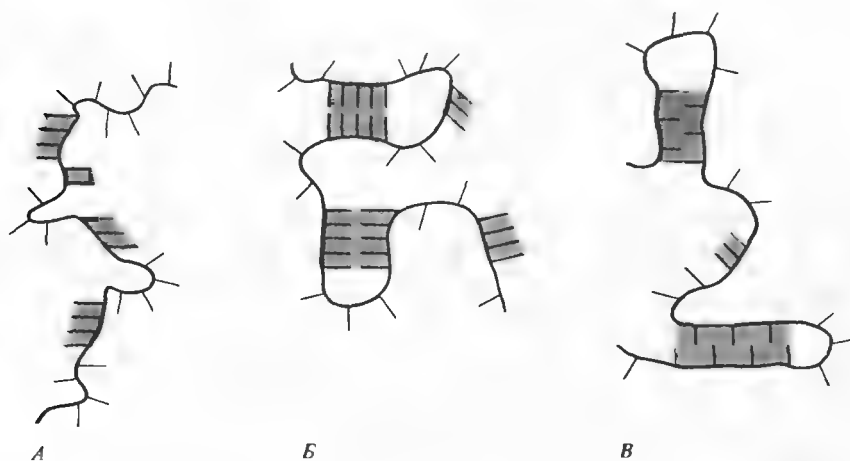


РИС. 22.4. Три гипотетические частично упорядоченные формы poly(rA) (или других гомополинуклеотидов). А. Стэкинг оснований. Б. Спаривание оснований. В. Интеркаляция оснований.

чительно проследить, почему этот вопрос трудно решить, изучая физические свойства растворов гомополинуклеотидов¹. В число возможных следует включить также два вида многоцепочечных структур (рис. 22.4Б, В). Они могут образовываться в пределах одной молекулы, так что никакого изменения молекулярной массы наблюдаться не будет. Хотя уотсон-криковское спаривание в гомополимерах невозможно, могут образовываться структуры (рис. 22.4Б) с другим типом связанных водородными связями пар оснований, известным из исследований на модельных системах. Второй вид возможной двухцепочечной структуры в гомополимере образуется при интеркаляции соседних оснований с формированием стопок из расположенных поочередно оснований то одной, то другой цепи (рис. 22.4В). Такую структуру можно сравнить с системой из двух сцепленных шестеренок.

Для таких гомополимеров, как poly(A) и poly(C), спаривание оснований при нейтральных pH может быть полностью исключено. Особенно чувствительными к образованию водородных связей являются инфракрасные спектры, однако в спектрах большинства гомополинуклеотидов при нейтральных pH не наблюдается никакого сдвига полос поглощения, который свидетельствовал бы об образовании каких-либо пар оснований. Тот же вывод может быть сделан из данных ЯМР: при спаривании оснований в ЯМР-спектрах тоже должен был бы наблюдаться характерный сдвиг резонансных линий (см. гл. 9).

Еще одним аргументом против спаривания оснований в одиночных гомополимерах служат результаты исследования полимеров, содержащих аналоги оснований. Имеются данные о существовании упорядоченной структуры, аналогичной той, которая наблюдалась для обычных гомополимеров, у полимеров, в которых положения, соответствующие возможным донорам или акцепторам водородных связей (такие, как N-1, N-6 и N-7 в пуринах), блокированы метилированием. Более косвенные данные получены при анализе результатов химической модификации. Такие реагенты, как формальдегид, очень легко вза-

¹ Для малых молекул межмолекулярные ассоциаты всегда можно выявить по зависимости физических свойств раствора от концентрации. Однако для полимеров межмолекулярное взаимодействие может быть столь велико, что разбавление, необходимое для предотвращения комплексобразования, исключает возможность использования какого бы то ни было физического метода.

имодельствуют с N-аминогруппы poly(A), участвующей в уотсон-криковском спаривании, и не реагируют ни с какой другой группой аденозина (если рассматривать близкие времена). Тритиевый обмен в случае одноцепочечных гомополимеров также происходит намного быстрее, чем для известных двухцепочечных структур. Однако следует быть очень осторожным, основываясь лишь на этих данных. Такие же высокие скорости рассмотренных процессов могут наблюдаться и для двухцепочечных структур, способных к быстрому раскрытию и схлопыванию.

Никакие из рассмотренных выше данных не исключают возможности образования структур с интеркалированными основаниями. Даже если бы в распоряжении исследователей имелась достаточно упорядоченная форма гомополимера, гидродинамические данные или данные по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей не позволили бы с легкостью отличить структуру с интеркалированными основаниями от одноцепочечной структуры. В случае длинных жестких стержней эти методы позволяют определить массу на единицу длины. Для обеих форм — как со стэкингом в одиночной цепи (одна из цепей В-формы ДНК), так и со стэкингом интеркалированных оснований — на каждые 3,4 Å приходилось бы по одному основанию. Гидродинамические исследования poly(A) при низких температурах показывают, что среднее расстояние между остатками составляет 3,2 Å.

По-видимому, наиболее веским доводом против существования в растворе структуры с интеркалированными основаниями, представленным до сих пор, является нечувствительность нейтральной формы гомополимера к уменьшению ионной силы. Окончательный же ответ на этот вопрос дает сравнение свойств олиго- и полинуклеотидов, проведенное в следующем разделе.

Вывод о том, что гомополимеры образуют одноцепочечную спираль со стэкингом оснований, позволяют сделать результаты исследования дифракции рентгеновских лучей от волокон. Таким методом была определена структура poly(C) (рис. 22.5). Оказалось, что полимер представляет собой одноцепочечную спираль и что между соседними основаниями существует стэкинг-взаимодействие. Отметим, однако, что структура полимера сильно отличается от структуры одной из цепей обычной двойной спирали РНК или ДНК. Poly(C) имеет шесть оснований на виток, в то время как в двойных спиральях их 10 или 11.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК МОДЕЛЬ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Необходимую структурную информацию очень трудно извлечь даже из данных для простых гомополимеров, поэтому представляется нецелесообразным использовать их в качестве модели для изучения полинуклеотидов. Однако легко синтезировать олигонуклеотиды длиной от двух до шести звеньев, содержащие как обычные основания, так и самые разнообразные их аналоги. Используя такие олигонуклеотиды, удастся исследовать влияние на их структуру нуклеотидного состава и последовательности оснований, а также зависимость различных характеристик от длины цепи.

В принципе олигонуклеотиды обладают несколькими преимуществами по сравнению с полинуклеотидами. Их оптические свойства проще поддаются анализу, поскольку в них может осуществляться лишь ограниченное число таких взаимодействий, как экситонное. Спектры ЯМР олигонуклеотидов тоже значительно легче интерпретировать, чем спектры полинуклеотидов. Во-первых, число линий в спектрах олигонуклеотидов меньше, что облегчает как их регистрацию, так и идентификацию.

Во-вторых, благодаря меньшей молекулярной массе олигонуклеотидов по сравнению с полинуклеотидами можно работать с более концентрированными растворами. В-третьих, любые упорядоченные структуры, которые могут образовываться в этом случае,

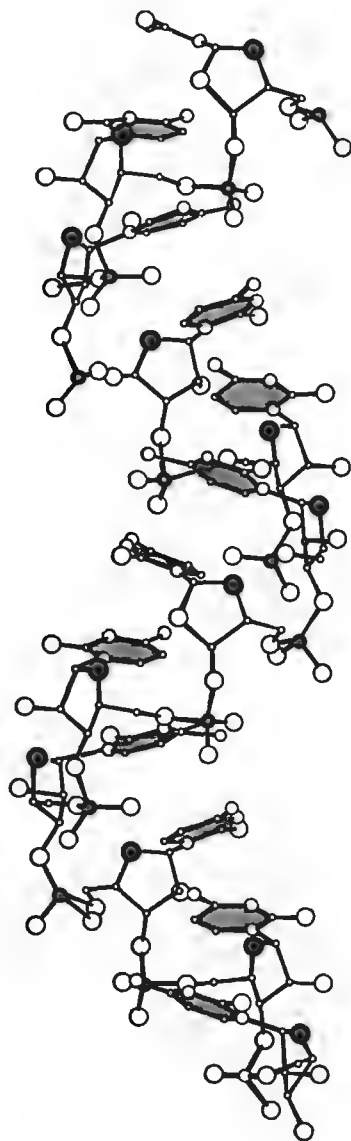


РИС. 22.5. Структура poly (C), определенная с помощью рентгеноструктурного анализа. Обратите внимание на значительный стэкинг соседних звеньев; основания на рисунке выделены цветом. (Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A. G. W., J. Mol. Biol., 106, 738, 1976.)

невелики по размеру и их переориентация осуществляется достаточно быстро, чтобы произошло усреднение дипольного уширения и линии резонансного поглощения были узкими. По ширине интервала плавления и кажущейся энтальпии конформационные изменения в олигонуклеотидах существенно отличаются от фазовых переходов. Далее, весьма полезным термодинамическим параметром, использование которого естественно и удобно для того, чтобы различить внутри- и межмолекулярные эффекты, является концентрация. И наконец, олигонуклеотиды — это достаточно малые молекулы, чтобы их можно было закристаллизовать и исследовать рентгеноструктурным методом.

Ценность всех этих преимуществ, однако, несколько снижается по следующим причинам. Олигонуклеотиды нельзя использовать для изучения дальних взаимодействий между

участками, удаленными друг от друга вдоль цепи. Если эти взаимодействия существенны, как в случае глобулярных третичных структур, олигонуклеотиды будут не очень хорошей моделью. В олигомерах должны проявляться все ближние термодинамические взаимодействия, которые играют роль в полимерах, и эти взаимодействия в таких малых модельных системах часто удается выделить и оценить по отдельности. Однако нет оснований а priori считать, что эти взаимодействия в олигомерах приведут к формированию структуры, идентичной (или хотя бы похожей) той, которую имеет полимер. Напомним, что олигомеры — это не что иное, как короткие полимеры, и если существуют концевые эффекты, то в случае олигомеров они будут играть большую роль в определении их структуры, чем для полимеров. Поэтому при экстраполяции структуры олигомера на случай полимера следует быть очень осторожным. Если удастся предсказать свойства данного полимера, исходя из предположения, что его структура сходна со структурой соответствующего олигомера, то, как правило, можно считать, что этот олигомер представляет собой адекватную структурную модель полимера.

Похожи ли физические свойства олигонуклеотидов на свойства гомополимеров, рассмотренные нами выше? Оптические свойства динуклеозидфосфатов совершенно иные, чем у мономеров (табл. 22.1). Такие соединения, как ApA и CpC, имеют существенно более интенсивные спектры КД, чем A и C. КД-спектры этих димеров по форме очень похожи на спектры poly(A) и poly(C), хотя амплитуды полос меньше. Для димеров, как и для полимеров, характерен гипохромизм, но степень гипохромизма меньше. Исключение составляет димер UpU: его оптические свойства близки к свойствам мононуклеозида U, но это же справедливо и для poly(U). Спектральные свойства димеров, как и полимеров, чувствительны к температуре, составу растворителя и pH. Подобно полимерам, димеры мало подвержены влиянию ионной силы. Все эти параллели дают основание считать, что димеры могут служить хорошей моделью для полимеров и что имеет смысл более детально исследовать их структуру.

Было выполнено несколько кристаллографических исследований коротких олигонуклеотидов. Имеющиеся данные можно разбить на три категории. Несколько соединений было изучено при кислых pH; они вряд ли могут служить хорошими моделями для нейтральных полинуклеотидов из-за различий в ионизации оснований. Другая категория соединений содержала самокомплементарные последовательности, такие, как CpC; они образуют в кристалле двухцепочечные структуры со спаренными основаниями и являются прекрасной моделью двойной спирали. Сейчас для нас более интересна третья категория соединений: нейтральные несамокомплементарные олигонуклеотиды. Самой интересной их особенностью является сближенное стопкообразное расположение оснований.

Изучение таких кристаллических структур позволяет получить богатую информацию о преимущественных значениях углов между связями и углов внутреннего вращения — информацию, которая важна для анализа конфигурации цепи. Однако рентгеноструктурный анализ дает лишь одну статическую картину конформации молекулы. В случае же одноцепочечных олигонуклеотидов или полинуклеотидов все имеющиеся данные для растворов свидетельствуют о наличии равновесия между двумя или более конформациями. Не ясно, является ли геометрия взаимного расположения оснований, наблюдаемая в кристаллических структурах, типичной для растворов или она характерна лишь для небольшой части молекул. Как бы то ни было, рентгеноструктурные данные являются важной отправной точкой в исследовании, и они показывают, что те положения, которые развивались до сих пор в этой главе, вели в правильном направлении.

СРАВНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Ранее мы рассмотрели данные, свидетельствующие о структурном различии дезокси- и рибоформ полинуклеотидов. Из рис. 22.6 видно, что различие в оптических свойствах со-

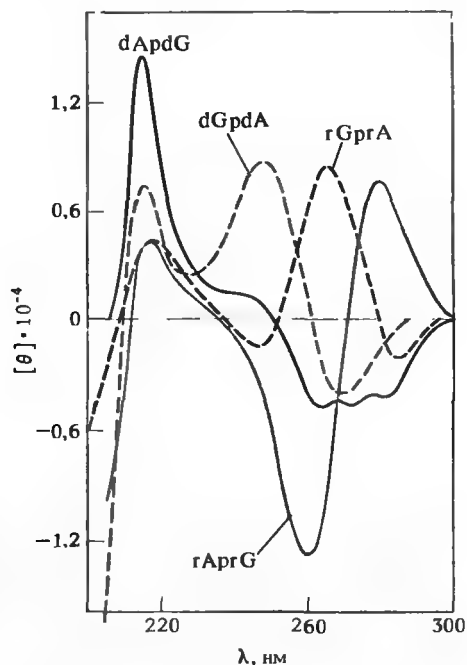


РИС. 22.6. Спектры кругового дихроизма четырех динуклеозидфосфатов, каждый из которых содержит по одному аденину и одному гуанину; pH 7. Спектры поглощения этих четырех соединений почти совпадают. (Warshaw M., Cantor C. R., *Biopolymers*, 9, 1079, 1971.)

храняется и на уровне димеров (динуклеозидфосфатов). Это наблюдение наводит на мысль, что детальный анализ структурных особенностей дезокси- и рибозформ димеров может помочь нам понять различия в поведении и структуре ДНК и РНК. Спектры поглощения ApG и GrA, а также их дезокси-аналогов очень близки; это свидетельствует о том, что электронные состояния у всех четырех соединений весьма сходны. Однако спектры КД для этих димеров сильно зависят от последовательности (рис. 22.6). Интенсивность спектров КД мононуклеозидов настолько мала, что фактически все спектральные эффекты, которые можно видеть из этого рисунка, должны быть обусловлены взаимодействием между основаниями. Важнейшим структурным фактором, от которого зависит спектр КД, является относительная ориентация и расстояние между двумя хромофорами. Отсюда следует, что ориентация оснований в ApG и GrA должна быть различной. Поскольку оба соединения обладают заметным гипохромизмом, в каждом из них существует стэкинг оснований. Поэтому для того, чтобы объяснить наблюдаемые различия, необходимо прежде всего определить угол между основаниями в стопке.

Очевидной конформацией, в рамках которой можно объяснить наблюдаемые эффекты, является спиральная структура. Рассмотрим молекулу ArGpA. Если бы она принимала спиральную конформацию, взаимная ориентация моментов перехода для первого A и G была бы отлична от взаимной ориентации моментов перехода для G и второго A. Пусть, например, угол между моментами определенных переходов для A и G в том случае, когда связи $N^9 - C^{1'}$ двух нуклеотидов параллельны, равен α . Если угол спирального вращения равен θ , то угол между моментами переходов в ArG будет равен $\theta - \alpha$, тогда как в GrA он составит $\theta + \alpha$. Отсюда сразу следует, что спектры КД для ArG и GrA должны различаться, даже если структура фосфодиэфирного остова и углы вращения вокруг гликозидной связи для обоих димеров одинаковы.

Попытки строгого вычисления спектров КД GrA и ArG с помощью описанных в гл. 8 методов не привели к успеху. Это связано с тем, что электронная структура гуанина из-

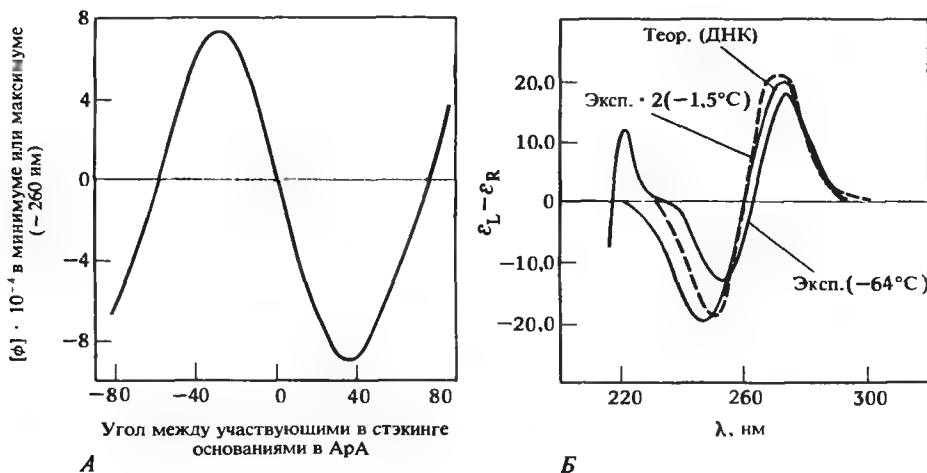


РИС. 22.7. Оптическая активность динуклеотида ApA. А. Теоретическая зависимость максимума или минимума оптического вращения в длинноволновой области от угла между основаниями. График зависимости максимума или минимума спектра КД в этой области имел бы почти такой же вид. (Bush C. A., Tinoco I., Jr., J. Mol. Biol., **25**, 601, 1967.) Б. Теоретические и экспериментальные спектры КД. Расчеты были выполнены для ApA с конформацией, соответствующей В-форме ДНК. (Johnson W. C., Tinoco I., Jr., Biopolymers, **8**, 715, 1969.)

вестна лишь приближенно. Основание А изучено в этом отношении гораздо лучше. На рис. 22.7 показана зависимость угла поворота плоскости поляризации от угла между основаниями для ApA, рассчитанная по уравнению (8.19). При этих вычислениях предполагалось, что основания расположены в параллельных плоскостях, а угол между ними изменялся. Знак и величина угла поворота плоскости поляризации очень чувствительны к изменению угла между основаниями. Согласно расчетам, в области значений угла около 30° должен наблюдаться максимум поглощения и поворот плоскости поляризации на большой отрицательный угол, и именно такая ситуация имеет место на опыте. На рис. 22.7, Б приведен спектр КД, вычисленный для указанной выше геометрии расположения оснований, а также спектры, полученные экспериментально. Хотя расчеты были приближенными и при моделировании структуры варьировался лишь один угол вращения, а не проводилась оптимизация по всем разрешенным степеням свободы остова, согласие теории и эксперимента оказалось достаточно хорошим. Угол спирального вращения 30° образуется в правой спирали, в которой число звеньев на виток примерно такое же, как в В-форме ДНК. Поэтому результат, хотя и полученный для модели, соответствует реальной ситуации.

Оптические свойства ApA (а также всех других исследованных димеров) не меняются при изменении концентрации в тысячу раз. Эта инвариантность свойств указывает, что для формирования структуры этих соединений существенны лишь внутримолекулярные эффекты.

Сходство спектральных свойств димеров и полимеров позволяет считать, что полимеры также имеют одноцепочечную структуру. Структурную аналогию между димерами и полимерами можно проверить еще раз, если попытаться оценить оптические свойства полимера, исходя из полученных экспериментально свойств димеров. В таких полумпирических расчетах предполагается, что структура полимера не зависит от длины цепи и что оптические свойства определяются главным образом взаимодействием ближайших сосе-

дей. Соответствующие методы описаны в гл. 8. Для гомополимеров и димеров используемые соотношения выглядят очень просто. Например, молярное вращение в расчете на звено полимера равно

$$[\phi]_{\text{polyN}} = 2[\phi]_{\text{NpN}} - [\phi]_{\text{N}} \quad (22.5)$$

где $[\phi]_{\text{NpN}}$ — молярное вращение на звено димера NpN, а $[\phi]_{\text{N}}$ — молярное вращение нуклеозида N. На рис. 22.8 сравнивается кривая, вычисленная для poly(C), с экспериментальными результатами; согласие оказывается удивительно хорошим для такого простого подхода, и это дает веские основания полагать, что данные о структуре димеров могут быть перенесены на одноцепочечные полимеры.

В действительности приближение, состоящее в том, что пренебрегается влиянием на оптические свойства более далеких взаимодействий, чем взаимодействие ближайших соседей, не является слишком хорошим. В гл. 8 были высказаны соображения, что в жесткой упорядоченной структуре необходимо учитывать экситонные состояния, которые представляют собой линейные комбинации состояний всех мономеров. Однако гомополимеры при нейтральных pH и комнатной температуре не являются ни жесткими, ни полностью упорядоченными структурами. Эти нарушения регулярности приводят к уменьшению влияния дальних взаимодействий на оптические свойства. Другими словами, димеры оказываются хорошими моделями для одноцепочечных нуклеиновых кислот, поскольку они во многом сходны с небольшими стопкообразными кластерами, возникающими в полимерах в результате флуктуационных нарушений регулярной структуры.

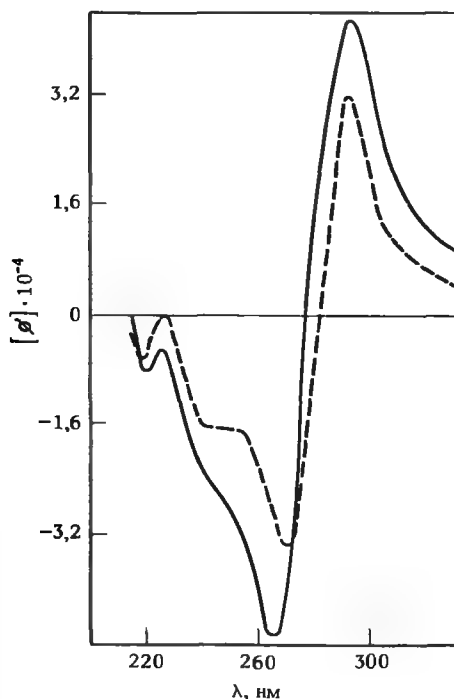


РИС. 22.8. Дисперсия оптического вращения poly(rC) при pH 7. Сплошная кривая — экспериментальные данные. Пунктирная кривая получена с помощью уравнения $[\phi]_{\text{poly(C)}} = 2[\phi]_{\text{CpC}} - [\phi]_{\text{C}}$ по результатам измерений величины $[\phi]_{\text{CpC}}$ и $[\phi]_{\text{C}}$ (Cantor C. R. et al., J. Mol. Biol., 20, 39, 1966.)

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУР С МЕЖПЛОСКОСТНЫМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ МЕТОДОМ ЯМР

Круговой дихроизм оказывается весьма полезным для исследования структуры в целом и является одним из немногих методов, которые позволяют связать исследования больших и малых структур. Для получения детальной картины, однако, следует использовать более информативные методы. К таким методам относится ЯМР, поскольку он позволя-

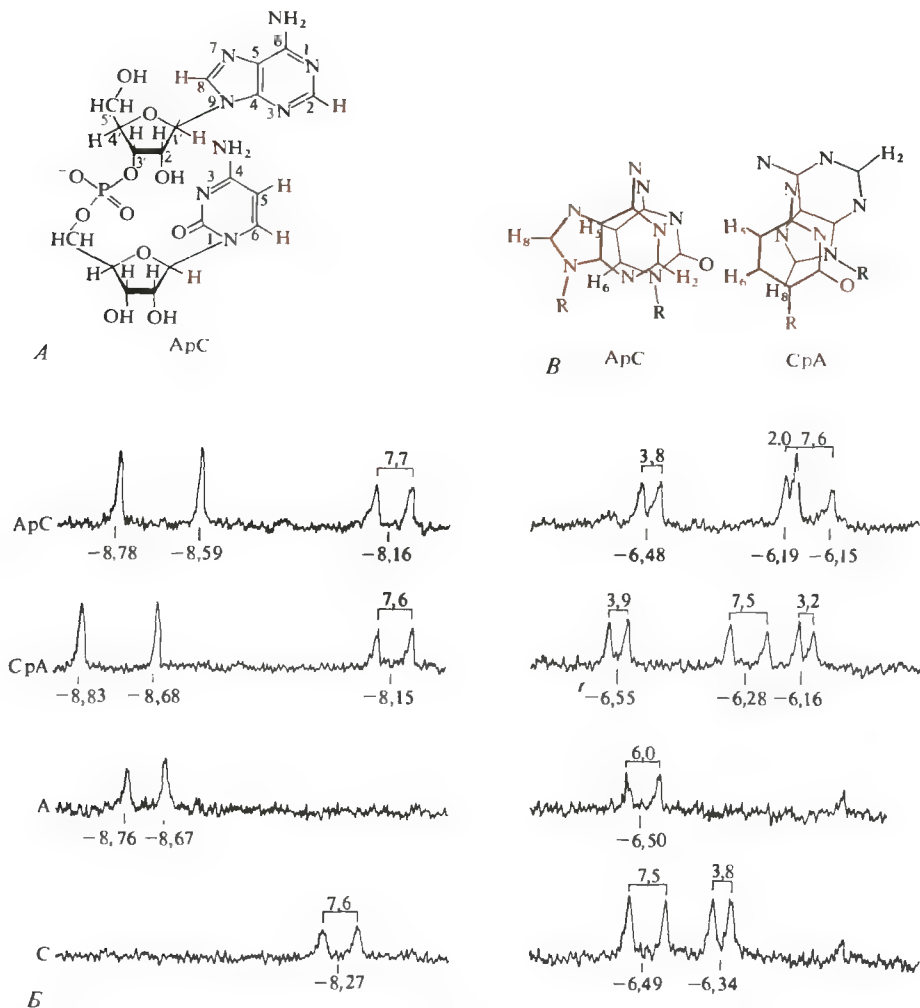


РИС. 22.9. Конформационный анализ ApC и CpA методом спектроскопии ЯМР. А. Структурная формула ApC ; регистрируемые протоны окрашены. Б. Усредненные по времени спектры ЯМР 0,01 М растворов мономеров и димеров при нейтральных рН в D_2O при 29°C . Под каждым пиком указан химический сдвиг в м.д.; над спектрами указаны константы расщепления в Гц. В. Возможные конформации динуклеотидов со стэкингом оснований, согласующиеся с данными ЯМР. (Bengter W., Chap S., J. Am. Chem. Soc., **91**, 3910, 1969.)

ет одновременно следить за большим числом разных протонов в олигонуклеотиде. В спектрах ЯМР пуринсодержащих динуклеозидфосфатов, например, отчетливо видны линии от протонов Н-2 и Н-8 аденина, от Н-8 гуанина и от Н-1 сахаров. Для пиримидинов можно разрешить линии от Н-5 и Н-6 в С и U, а также протоны метильной группы в Т. На рис. 22.9 приведены спектры ЯМР динуклеотидов АрС и СрА; основная трудность здесь состоит в установлении соответствия между протонами и линиями в спектре. Расшифровка спектров моонуклеозидов существенно облегчается тем, что в распоряжении исследователей имеется достаточно большое число химических производных. В спектрах димеров, однако, линии резонансного поглощения оказываются значительно сдвинутыми. Например, нельзя утверждать, что если в спектре мономера аденина сигнал от Н-8 наблюдается при меньшей напряженности поля, чем от Н-2, то в димере эти линии будут располагаться в той же последовательности.

Спектры протонного резонанса для АрС и СрА были расшифрованы следующим образом. При высоких температурах происходит обмен Н-8 протона в пурине. Поэтому, если прогреть образец в D₂O и потом снять спектр при комнатной температуре, интенсивность линии от Н-8 уменьшится. Спин-спиновое взаимодействие между пространственно сближенными протонами Н-5 и Н-6 цитидина приводит к расщеплению каждой из линий на дублет; константа расщепления для мономера цитидина составляет 7,6 Гц. Эта константа зависит от двугранного угла между двумя взаимодействующими протонами и не зависит от других магнитных взаимодействий. Пуриновое кольцо является плоским и не имеет внутренней свободы вращения. Поэтому угол между Н-5 и Н-6 в цитидине имеет в случае димера то же значение, что и в случае мономера. Совпадают, следовательно, и константы расщепления J_{5-6} , и это позволяет отличить протоны Н-5 и Н-6 цитидина от всех остальных. Линии, отвечающие этим двум протонам, расположены в спектре мономера так далеко от всех остальных, что нетрудно их различить и в спектре димера.

Необходимо еще идентифицировать линии от Н-1'-протонов рибозы А и С. Каждая из этих линий расщепляется до дублета из-за взаимодействия с соответствующим Н-2'-протоном рибозы. Константы расщепления $J_{1'-2'}$ для мономеров и димеров существенно различаются. Это понятно, поскольку конформация рибозного кольца может сравнительно легко изменяться. Мы не имеем оснований утверждать, что протону аденозина Н-1' в спектре димера соответствует дублет с константой расщепления, наиболее близкой к наблюдаемой для аденозина. Но мы можем различить линии от Н-1' для А и С по химическим сдвигам. Из-за близости кольца основания к протону Н-1' химический сдвиг этого протона в случае димера будет определяться природой основания, связанного с данным сахаром. Магнитная анизотропия кольцевых токов для аденина значительно больше, чем для цитозина. Это различие приводит к тому, что химический сдвиг для Н-1' в случае аденозина больше, чем в случае цитидина. Сдвиг происходит в сторону уменьшения поля, поскольку Н-1' лежит примерно в той же плоскости, что и основание. Хотя возможно вращение вокруг связи C^{1'}-N, химический сдвиг слабо зависит от конкретного значения угла вращения. Таким образом, оставшийся неидентифицированным дублет в области более низкой напряженности поля в спектрах СрА и АрС относится к протону Н-1' аденозина, а дублет в области более высокой напряженности — к протону Н-1' цитидина.

Теперь мы можем проанализировать структурную информацию, которую содержат спектры ЯМР димеров, приведенные на рис. 22.9. Наиболее существенным эффектом является значительный сдвиг в сторону увеличения поля для линий от всех трех протонов цитидина как в АрС, так и в СрА. Этот сдвиг должен быть обусловлен — по крайней мере отчасти — значительной анизотропией кольцевых токов в аденине. Магнитная анизотропия у цитидина очень мала, и для протонов аденина в СрА и АрС характерны значительно меньшие сдвиги. Отметим, что пики от Н-6 цитидина в димерах СрА и АрС сдвинуты относительно пика для изолированного цитидина почти одинаково. Напротив, пик от

H-5 цитидина в АрС сдвинут в сторону больших полей гораздо сильнее, чем для СрА. Это должно означать, что H-5 цитидина в АрС расположен ближе к центру аденинового кольца (где магнитная анизотропия достигает максимального значения), чем в СрА.

Кольцевые токи — это не единственная причина наблюдаемых спектральных различий. Заряженные фосфатные группы создают сильное электрическое поле, которое по-разному сказывается на свойствах оснований, расположенных на 5'- и 3'-концах, поскольку эти основания находятся на разном расстоянии от фосфатных групп. Все эти эффекты были учтены, по крайней мере полуколичественно, и привели к модели структуры динуклеозидфосфатов, представленной на рис. 22.9,В.

Для динамики межплоскостного взаимодействия характерны значительно меньшие времена, чем те, которые необходимы для получения спектров ЯМР, поэтому последние отражают свойства усредненных по времени структурных состояний. В большинстве случаев спектры ЯМР содержат недостаточную информацию для полного установления химической структуры. Нельзя получить почти никакой информации о наборе структур, по которым происходит усреднение по времени. Тем не менее результаты, приведенные на рис. 22.9, четко указывают на различие структур АрС и СрА. Модели, представленные на рис. 22.9,В, согласуются с данными ЯМР и с тем, что известно о стереохимических ограничениях для фосфодиэфирной связи. В обеих структурах имеет место межплоскостное взаимодействие оснований, образующих фрагмент правой спирали.

ИССЛЕДОВАНИЯ РИБО- И ДЕЗОКСИ-ДИМЕРОВ МЕТОДОМ ЯМР

Идентифицировать линии в спектрах ЯМР для гомодимеров или гомоолигомеров большей длины значительно сложнее. В спектре АрА имеются четыре пика от протонов ароматических колец и два дублета от H-1'. Использование метода дейтериевого обмена позволяет отличить два пика, отвечающих H-8, от двух пиков H-2, а химические сдвиги протонов H-1' различаются достаточно сильно, чтобы можно было их идентифицировать по положению в мономерах. Однако один серьезный вопрос остается нерешенным: необходимо разграничить линии от протонов, принадлежащих 5'-аденозину (рА) и 3'-аденозину (Ар). Наиболее эффективный подход состоит в добавлении парамагнитных ионов Mn^{II} , которые, как известно, связываются прежде всего с фосфатными группами олигонуклеотидов. Парамагнитные ионы обладают большим собственным магнитным дипольным моментом, связанным со спином электрона. Этот диполь взаимодействует с ядерным диполем, что приводит к уширению спектральных линий соседних протонов. Эффект очень сильно зависит от расстояния, поскольку вероятности переходов, вызванных диполь-дипольным взаимодействием, изменяются обратно пропорционально шестой степени расстояния. Таким образом, проанализировав влияние Mn^{II} на ширину всех линий, можно оценить относительное удаление соответствующих протонов от фосфатной группы.

На рис. 22.10 приведена структурная формула АрА. В соответствии с изложенными в гл. 6 представлениями о конформациях нуклеиновых кислот, оба основания изображены с углами поворота, соответствующими *анти*-конформации. Легко видеть, что протон H-8 в рА расположен ближе к фосфатной группе, чем этот же протон в Ар. Поэтому линия от этого протона в рА будет испытывать большее уширение под влиянием ионов Mn^{II} , что и позволяет провести идентификацию. Напротив, протон H-1' в рА расположен дальше от фосфатной группы, так что уширение для него будет меньше, чем в случае H-1' в Ар. К сожалению, два протона H-2 расположены далеко от фосфатной группы и приблизительно эквидистантно, так что связывание Mn^{II} не помогает их идентификации. В этом случае приходится использовать менее прямые данные. Во многих случаях лучшее, что

Таблица 22.2

ИЗМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СДВИГОВ ПРОТОНОВ ОСНОВАНИЯ
И Н-1'-ПРОТОНОВ ПРИ ДИМЕРИЗАЦИИ АДЕНИНА С ОБРАЗОВАНИЕМ
АДЕНИДИНУКЛЕОЗИДМОНОФОСФАТОВ ПРИ 4 °С (D₂O, pD 7,4)^{1),2)}

Динуклеозид	$\Delta\delta_{3'}$			$\Delta\delta_{5'}$		
	H-8	H-2	H-1'	H-8	H-2	H-1'
rAprA	- 0,155	- 0,315	- 0,285	- 0,285	- 0,11	- 0,19
rApdA	- 0,15	- 0,225	- 0,325	- 0,23	- 0,15	- 0,225
dApdA	- 0,325	- 0,31	- 0,42	- 0,16	- 0,175	- 0,275
dAprA	- 0,32	- 0,28	- 0,41	- 0,16	- 0,21	- 0,25

¹⁾ Ts'o P.O.P., Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, v. 2, New York, Academic Press, 1974.

²⁾ $\Delta\delta_{3'} = \delta_{\text{APa}} - \delta_{\text{Ap}}$ и $\Delta\delta_{5'} = \delta_{\text{APa}} - \delta_{\text{Pa}}$. Подчеркнуто основание, за которым велось наблюдение в димере.

структур dApdA и rAprA. Главное различие между этими структурами состоит в большем перекрывании оснований в дезокси-димере и большем угле спирального вращения (большем угле поворота спирали при переходе от одного основания к другому) в рибодимере. Оптические данные, приведенные в табл. 22.1, подтверждают эти выводы. Для dApdA характерен больший гипохромизм, чем для rAprA; это согласуется с большим перекрыванием оснований в стопкообразной конформации dApdA, хотя может быть связано просто с тем, что в спиральной (противоположной структуре без стэкинг-взаимодействий) конформации находится большее число молекул этого димера.

rAprA обладает большей оптической активностью, чем dApdA. Оптическая активность APa должна уменьшаться при уменьшении угла между основаниями от 40 до 20° или ниже (рис. 22.7,4). Таким образом, меньшая интенсивность КД dApdA может быть связана с меньшим углом спирального вращения, хотя из-за большего стэкинга в этом случае наблюдается более высокий гипохромизм. Это находится в полном согласии с теми выводами, которые следуют из данных ЯМР. С помощью оптических методов и ЯМР были исследованы также некоторые тринуклеозиддифосфаты. Большинство результатов свидетельствует о том, что в случае обычных оснований А, У (или Т) и Г короткие олигомеры образуют гомологические ряды не только по химической структуре, но также и по средней конформации, принимаемой соседними звеньями. На рис. 8.10 приведены оптические данные, которые подтверждают этот вывод.

КОНФОРМАЦИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ В ДИНУКЛЕОТИДАХ

Как следует из предыдущего рассмотрения, у одноцепочечных олиго- и полинуклеотидов значительная доля оснований участвует в стэкинге, но в то же время эти структуры не являются жесткими или полностью упорядоченными. Поэтому помимо конформации стопкообразной структуры мы должны знать, какую часть времени каждое основание проводит в спиральном состоянии. Скорости встраивания и выхода оснований из упорядоченной конформации столь велики, что их невозможно измерить обычными методами исследования быстрых процессов. Поэтому, учитывая быстрое установление равновесия между упорядоченной и неупорядоченной формами, нам нужно определить лишь долю оснований в стопкообразной конформации и зависимость этого параметра от внешних условий.

Простейшая модель, которую можно себе представить для описания конформационного перехода в динуклеотиде NpN , рассматривает только два состояния: полностью упорядоченное (стопкообразное) $\text{NpN}_{\text{ст}}$ и неупорядоченное $\text{NpN}_{\text{н}}$. Переход $\text{NpN}_{\text{н}} \rightleftharpoons \text{NpN}_{\text{ст}}$ характеризуется константой равновесия образования стопкообразной структуры, равной

$$K_{\text{ст}} = (\text{NpN}_{\text{ст}})/(\text{NpN}_{\text{н}}) \quad (22.6a)$$

$$\Delta G_{\text{ст}}^0 = -RT \ln K_{\text{ст}} = \Delta H_{\text{ст}}^0 - T\Delta S_{\text{ст}}^0 \quad (22.6b)$$

Если определить константу равновесия как функцию температуры, то энтальпию стэкинга можно вычислить из соотношения Вант-Гоффа, $\Delta H_{\text{ст}}^0 = -RTd(\ln K_{\text{ст}})/d(1/T)$, а энтропию — по формуле $\Delta S_{\text{ст}}^0 = [\Delta H_{\text{ст}}^0 - \Delta G_{\text{ст}}^0(T)]/T$. Зависимость $\ln K_{\text{ст}}$ от $1/T$ должна быть линейной, если энтальпия стэкинга не зависит от температуры. Последнее следует из того, что образование стопкообразных структур сопряжено с пренебрежимо малым изменением теплоемкости.

Теория переходов в рамках модели двух состояний подробно обсуждается в гл. 21. Здесь же нам необходимы два важных вывода. Во-первых, для модели двух состояний измерение любого физического параметра, который дает долю упорядоченной или неупорядоченной формы, должно приводить к одинаковым значениям константы равновесия и, следовательно, к одинаковым $\Delta H_{\text{ст}}^0$. Во-вторых, энтальпия стэкинга, определенная из уравнения Вант-Гоффа, должна совпадать со значением $\Delta H_{\text{ст}}^0$, получаемым из калориметрических измерений. Большинство физических, и в частности все оптические свойства, являются линейной функцией свойств чистой стопкообразной ($A_{\text{ст}}$) и неупорядоченной ($A_{\text{н}}$) форм. Наблюдаемая спектральная интенсивность A (или другой физический параметр) определяется соотношением

$$A = \chi_{\text{ст}}A_{\text{ст}} + \chi_{\text{н}}A_{\text{н}} \quad (22.7)$$

где $\chi_{\text{ст}}$ — мольная доля стопкообразных димеров, а $\chi_{\text{н}}$ — мольная доля димеров, находящихся в неупорядоченном состоянии. Это соотношение позволяет записать константу равновесия для образования упорядоченной формы как

$$K_{\text{ст}} = \chi_{\text{ст}}/\chi_{\text{н}} = (A - A_{\text{н}})/(A_{\text{ст}} - A_{\text{н}}) \quad (22.8)$$

[ср. с уравнением (6.1)].

Таким образом, константа равновесия может быть определена при любых условиях, если известны физические свойства полностью упорядоченной и неупорядоченной форм. В этом, однако, и состоит основная проблема. Стэкинг олигонуклеотидов изменяется с температурой очень плавно. В некоторых случаях полностью неупорядоченное состояние может быть получено при 100°C ; в других случаях, для оценки $A_{\text{н}}$ могут быть использованы свойства мономеров. Определить $A_{\text{ст}}$ можно только в том случае, если создать условия, соответствующие чистой упорядоченной форме. Для этого понижают температуру до тех пор, пока A не выйдет на некоторый постоянный уровень. Во многих случаях необходимая для этого температура оказывается очень низкой, до -80°C . Чтобы получить такие температуры, можно использовать в качестве растворителя концентрированные водные растворы LiCl (рис. 22.11). Однако термодинамические параметры стэкинга, полученные при этих условиях, необходимо каким-то образом экстраполировать к условиям разбавленного солевого раствора.

При изучении перехода между двумя состояниями и других конформационных переходов часто бывает удобно определить температуру плавления¹ $T_{\text{м}}$ аналогично тому, как это делается в случае резкого температурного перехода, наблюдаемого при истинных фа-

¹ Величину $T_{\text{м}}$ правильнее было бы называть температурой полуперехода, чем температурой плавления.

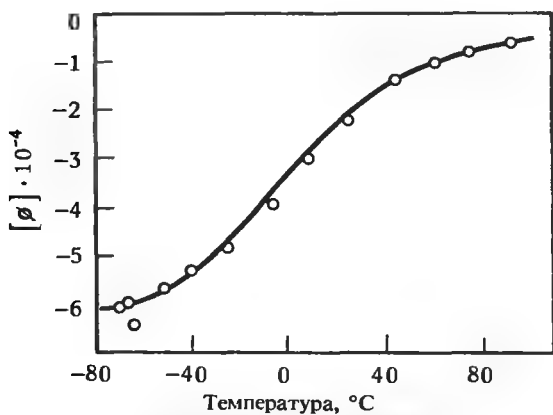


РИС. 22.11. Зависимость оптического вращения АрА при 262 нм в 25,2%-ном растворе LiCl (pH 7) от температуры. (Davis R., Tinoco I., Jr., Biopolymers, 6, 223, 1968.)

зовых превращениях. Это та температура, при которой $\Delta G_{\text{ст}}^0 = 0$ и $K_{\text{ст}} = 1$. Следовательно, но,

$$T_m = \Delta H_{\text{ст}}^0 / \Delta S_{\text{ст}}^0 \quad (22.9)$$

Определить T_m для резкого перехода не составляет труда. Если же переход совершается в широком интервале температур, то единственная возможность оценки этого параметра состоит в определении $\Delta G_{\text{ст}}^0$ как функции температуры. Можно попытаться, рассматривая данные по температурной зависимости, подобные приведенным на рис. 22.11, принять за T_m температуру, отвечающую точке максимального наклона кривой, но это будет неверно. В действительности T_m соответствует температуре максимального наклона только тогда, когда данные представлены в виде зависимости от $1/T$ (см. Дополнение 22.1).

Дополнение 22.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ T_m ДЛЯ ШИРОКОГО ПЕРЕХОДА

При $T = T_m$ величина $\chi_{\text{ст}}$ равна 1/2. Температура, при которой наклон кривой $A(T)$ максимален, определяется соотношением $d^2A/dT^2 = 0$. Из уравнения (22.7) следует, что это эквивалентно условию $d^2\chi_{\text{ст}}/dT^2 = 0$. Из уравнений (22.6) и (22.8) нетрудно получить, что

$$d\chi_{\text{ст}}/dT = \chi_{\text{ст}}(1 - \chi_{\text{ст}})\Delta H_{\text{ст}}^0/RT^2$$

В результате дальнейшего дифференцирования получаем, что при температуре, соответствующей максимальному наклону, мольная доля оснований, между которыми существует стэкинг, равна

$$\chi_{\text{ст}} = 1/2 - RT/\Delta H_{\text{ст}}^0$$

Таким образом, температура, отвечающая максимальному наклону кривой, совпадает с температурой плавления только в пределе очень резких переходов с высокой $\Delta H_{\text{ст}}^0$. Этого несоответствия можно избежать, если представить A как функцию T^{-1} , поскольку $d\chi_{\text{ст}}/dT^{-1} = -\chi_{\text{ст}}(1 - \chi_{\text{ст}})\Delta H_{\text{ст}}^0/R$ и (для модели двух состояний) температура, при которой наклон максимален, соответствует $\chi_{\text{ст}} = 1/2$ и, следовательно, совпадает с T_m .

К сожалению, модель двух состояний плохо согласуется с данными по стэкингу в олигонуклеотидах. Значения кажущейся энтальпии Вант-Гоффа, определенные с помощью разных оптических методов, существенно различаются. Измерения ДОВ и КД для димера гАргА дают значения $\Delta H_{\text{ст}}^0$ между $-5,3$ и $-8,0$ ккал $\cdot$ моль $^{-1}$, в то время как из данных по гипохромизму следует, что эти значения лежат между $-8,5$ и -10 ккал $\cdot$ моль $^{-1}$. В значительной степени этот разброс можно объяснить трудностями в выборе низкотемпературного предела $A_{\text{ст}}$ для данного оптического параметра A . Более убедительное доказательство того, что модель двух состояний не вполне пригодна для описания стэкинга в димерах, дает ЯМР. Согласно модели двух состояний, химический сдвиг для каждого протона должен изменяться при изменении температуры от величины, отвечающей димеру, до величины, отвечающей мономеру, давая одну и ту же кривую плавления (такую же, как и получаемая из оптических данных). На опыте, однако, для разных протонов получаются слегка различающиеся кривые, и это означает, что разные линии резонансного поглощения по-разному зависят от разных конформаций из полного набора состояний динуклеотида для данных условий. Например, энтальпия Вант-Гоффа $\Delta H_{\text{ст}}^0$, получаемая из данных для протона Н-2, который принадлежит 3'-связанному аденину А в АрА, равна -11 ккал $\cdot$ моль $^{-1}$, что превышает по абсолютной величине значения, получаемые из любых оптических данных.

При дальнейшем рассмотрении мы будем игнорировать некоторые из этих усложняющих обстоятельств и для оценки стабильности различных структур, образуемых нуклеиновыми кислотами, будем использовать кажущиеся значения энтальпии, полученные для модели двух состояний или для других упрощенных моделей. Поэтому важно подчеркнуть приближенный характер таких измерений вант-гоффовской энтальпии $\Delta H_{\text{ст}}^0$. В принципе проблему можно решить, проведя прямое калориметрическое измерение величины $\Delta H_{\text{ст}}^0$, но для одноцепочечных олигонуклеотидов это довольно трудная задача. Величина $\Delta H_{\text{ст}}^0$ мала, и поэтому для надежного измерения теплотогощения необходимы высокие концентрации. К настоящему времени выполнено всего несколько калориметрических исследований такого рода (см. Дополнение 6.1).

СТЭКИНГ-РАВНОВЕСИЕ КАК ФУНКЦИЯ ДЛИНЫ ЦЕПИ

Рассмотренные выше спектральные изменения, связанные со стэкингом, становятся более существенными с увеличением длины олигомеров. Это понятно, поскольку даже для частично упорядоченных структур вероятность образования стопки из нескольких оснований весьма значительна. В то же время в полностью упорядоченном полимере имеется вдвое больше стэкинг-взаимодействий ближайших соседей в расчете на звено, чем в упорядоченном димере. В действительности для одноцепочечных гомеолигомеров с длиной цепи больше десяти звеньев оптические свойства практически не зависят от длины цепи.

Как зависят от длины цепи термодинамические параметры стэкинга? Прежде всего необходимо ответить на вопрос: что является энергетически более выгодным — образование еще одного стэкинга рядом с уже существующей упорядоченной областью или формирование новой упорядоченной области из двух оснований, не входивших ранее в состав упорядоченных участков? Пусть процесс увеличения упорядоченной области характеризуется константой равновесия s ; тогда константа, описывающая образование новой области, может быть представлена как σs , где σ — параметр нуклеации. Если $\sigma > 1$, новая упорядоченная область образуется легче, чем увеличивается размер уже существующей; этот случай называют случаем антикооперативности. Если $\sigma < 1$, имеет место обратная ситуация и конформационный переход можно назвать кооперативным. Кажущаяся энтальпия, определенная из соотношения Вант-Гоффа, будет увеличиваться при уменьшении σ . Проще всего убедиться в этом, рассмотрев крайний случай перехода по принципу

«все или ничего» в тримере. Здесь имеются лишь два состояния, которые соответствуют полностью неупорядоченной и полностью упорядоченной структурам. Энтальпия ΔH^0 этого процесса является суммой энтальпий двух стэкинг-взаимодействий. Результирующая кривая плавления в этом случае будет круче, чем для перехода, в котором могут реализоваться промежуточные состояния.

Это качественное описание может быть переведено на количественный язык с помощью модели, основанной на принципах статистической механики и совершенно аналогичной той, которая использовалась для описания переходов в полипептидах (гл. 20). При анализе экспериментальных данных нужно учесть зависимость оптических свойств от длины цепи. Это несколько усложняет вычисления, но мы не будем здесь на них останавливаться сколько-нибудь подробно, так как экспериментальные результаты на самом деле оказываются очень простыми (рис. 6.12 и 6.13).

Для таких олигонуклеотидов, как $\text{oligo}(\text{rA})$, характерна очень небольшая кооперативность. Температура плавления $\text{poly}(\text{A})$ не более чем на 20°C выше температуры плавления димеров. Кажущаяся энтальпия ΔH^0 почти не зависит от длины цепи. Детальный анализ дает значение σ между 0,8 и 0,5 (значение σ , равное 1,0, соответствует полностью некооперативному конформационному переходу). Для олигодезоксиаденилатов, по-видимому, характерна небольшая антикооперативность. Эти результаты радикально отличаются от термодинамических характеристик α -спирали, а также от характеристик двухцепочечных структур (см. ниже). Они, однако, находятся в согласии с изложенными выше общими представлениями о свойствах одноцепочечных спиралей нуклеиновых кислот.

22.3. Равновесие между одно- и двухцепочечными структурами

Все природные ДНК, за немногим исключением, являются совершенными двойными спиральями, состоящими из двух комплементарных одиночных цепей. Тем не менее, согласно современным представлениям, в процессе копирования хранимой в ДНК информации при репликации или в процессе считывания этой информации при транскрипции в молекуле ДНК должны образовываться локальные одноцепочечные области путем расплетания двойной спирали с помощью белков-посредников. Поэтому эксперименты, в которых изучаются характеристики перехода между двух- и одноцепочечной конформациями ДНК, имеют первостепенное биологическое значение. Большинство физических исследований таких переходов были проведены на ДНК в отсутствие белков. Простота этой системы значительно облегчает ее изучение. Некоторые из этих экспериментов мы рассмотрим в данной главе. В конечном счете нам не избежать сложной проблемы учета белков, чтобы понять их роль в рассматриваемых физических процессах.

Большая часть РНК синтезируется в клетке в виде одиночных цепей. Однако имеется явная тенденция к образованию в РНК внутримолекулярных областей со спаренными основаниями, и большая часть РНК, по-видимому, имеет совершенно определенную упорядоченную вторичную структуру. Таким образом, для того, чтобы научиться предсказывать допустимые конформации РНК при заданных условиях, нам необходимо понять, какие термодинамические силы определяют стабильность таких структур.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ КАК МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

Первые представления о конформационных превращениях в двух- и одноцепочечных нуклеиновых кислотах были получены в основном при исследовании гомополинуклеотидов

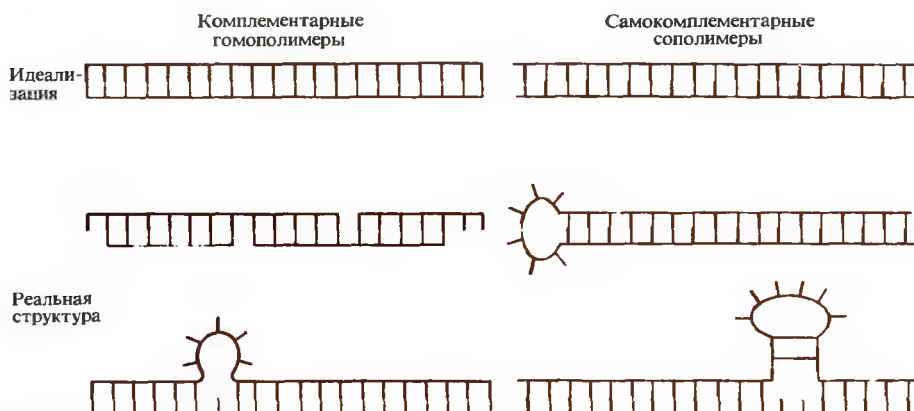


РИС. 22.12. Идеализированные и реальные схемы спаривания оснований в комплементарных гомополимерах типа $\text{poly}(\text{rA} \cdot \text{rU})$ и самокомплементарных сополимерах типа $\text{poly}[\text{d}(\text{A} - \text{T}) \cdot \text{d}(\text{A} - \text{T})]$.

или нуклеиновых кислот с простыми повторяющимися последовательностями. Такие соединения можно легко синтезировать ферментативным путем. Как модельные системы они имеют два важных достоинства. Во-первых, их структура и стабильность постоянны по всей молекуле, и поэтому эффекты, связанные с гетерогенностью, отсутствуют. Во-вторых, в большинстве случаев отдельные цепи являются простыми спиралями со стопкообразным взаимодействием оснований, что позволяет сконцентрировать внимание на тех свойствах, которые связаны только с двухцепочечными комплексами.

Эти модельные системы имеют, однако, и некоторые недостатки. Препараты синтетических полинуклеотидов характеризуются обычно некоторым распределением по длинам цепей. Двухцепочечные комплексы, образованные из смеси комплементарных гомополимеров, могут агрегировать, имеют неспаренные концы или петли (рис. 22.12). Это же относится к большинству полимеров с простыми чередующимися последовательностями. Самокомплементарные чередующиеся последовательности, такие, как $\text{poly}[\text{d}(\text{AT})] \cdot \text{d}(\text{AT})$, могут образовывать, помимо совершенных двойных спиралей, шпильки и петли. Для большинства оптических методов все эти осложняющие обстоятельства не играют роли, но при гидродинамических исследованиях они могут оказаться существенными.

Большая часть двухцепочечных полинуклеотидных комплексов образуется путем смешивания изолированных препаратов одиночных цепей в условиях, когда конформационное равновесие сильно смещено в сторону образования двойной спирали. Для молекул РНК, ДНК и гибридов РНК—ДНК, которые могут быть получены этим путем, справедлива та же схема спаривания оснований, которая наблюдается в кристаллах или в неводных растворах мономеров и известна для природных ДНК. Во всех возможных комбинациях рибо- и дезокси-цепей основание G спаривается с C, а A с T (или с U). Во многих модельных системах, однако, $\text{poly}(\text{G})$ заменяется $\text{poly}(\text{I})$ (инозин). В отличие от других гомополимеров, $\text{poly}(\text{G})$ редко находится в одноцепочечной форме (а возможно, и не находится вообще), даже в строго денатурирующих условиях. Точная структура $\text{poly}(\text{G})$ до конца не установлена. Известно, однако, что мономеры гуанина образуют в концентрированных растворах четырехцепочечные спиральные комплексы, связанные водородными связями. Возможно, что-то подобное имеет место и в случае $\text{poly}(\text{G})$. Тем не менее, какова бы ни была реальная структура этого полимера, она является настолько устойчивой, что реакция $\text{poly}(\text{C}) + \text{poly}(\text{G}) \rightarrow \text{poly}(\text{C} \cdot \text{G})$ идет с очень большим трудом, и для образования двойной спирали нужно использовать другой, менее прямой путь. $\text{Poly}(\text{I})$ при высоких

концентрациях соли и низких температурах также образует многоцепочечный комплекс. $\text{Poly}(\text{rI})$ при этих условиях образует трехцепочечную структуру, но она легко разрушается в ходе реакции $\text{poly}(\text{rC}) + 1/3\text{poly}(\text{rI}_3) \rightarrow \text{poly}(\text{rC} \cdot \text{rI})$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИИ КОМПЛЕКСОВ ПО КРИВОЙ СМЕШИВАНИЯ

Как определить, что из двух полинуклеотидов получился двухцепочечный комплекс? Пожалуй, наиболее прямым и простым методом является спектроскопическая регистрация кривой смешивания. Этот метод иллюстрируется здесь на примере УФ-поглощения, но он является совершенно общим. Рассмотрим смесь $\text{poly}(\text{A}) + \text{poly}(\text{U})$. Если между этими полимерами нет взаимодействия, поглощение раствора, налитого в кювету с длиной оптического пути 1 см, определяется законом Бэра

$$A = C_A \varepsilon_A + C_U \varepsilon_U \quad (22.10)$$

где C — концентрация в молях звеньев на литр, а ε — коэффициент экстинкции в расчете на моль звеньев. Предположим, что $\text{poly}(\text{A})$ и $\text{poly}(\text{U})$ образуют комплекс X . В общем случае комплекс может содержать произвольное число цепей $\text{poly}(\text{A})$ и $\text{poly}(\text{U})$. Поглощение образца определяется соотношением

$$A = C_A \varepsilon_A + C_U \varepsilon_U + C_X \varepsilon_X \quad (22.11)$$

где C_X — концентрация комплекса в молях звеньев на литр, а ε_X — коэффициент экстинкции в расчете на моль звеньев комплекса.

Классический эксперимент по смешиванию состоит в изменении соотношения между компонентами при постоянной общей их концентрации (C_0). Уравнение (22.11) применимо для любых смесей и может быть для удобства переписано для мольных долей общего числа звеньев, обозначаемых для каждой из форм как χ_A , χ_U и χ_X , так что

$$A = C_0(\chi_A \varepsilon_A + \chi_U \varepsilon_U + \chi_X \varepsilon_X) \quad (22.12)$$

В общем случае мольные доли каждого компонента в равновесной смеси неизвестны (хотя их можно найти методом многокомпонентного спектрального анализа, аналогичного тому, который описан в гл. 8 применительно к установлению соответствия между спектральными данными и вторичными структурами). Известны лишь мольные доли звеньев A и U , первоначально введенных в смесь; мы будем обозначать эти доли через χ_A^0 и $\chi_U^0 = 1 - \chi_A^0$.

Предположим, что мольные доли звеньев A и U в комплексе X равны γ и $1 - \gamma$ соответственно. Рассмотрим предельный случай, когда стабильность комплекса столь велика, что, если звенья A и U присутствуют в смеси в стехиометрическом отношении $\gamma:(1 - \gamma)$, свободных одиночных цепей в растворе не остается. Предположим далее, что в конкретном образце отношение $\chi_A^0 : \chi_U^0$ больше, чем $\gamma:(1 - \gamma)$. Тогда все звенья U будут входить в состав комплексов, на которые будет израсходовано $\gamma/(1 - \gamma)$ звеньев A на каждое звено U . Оставшиеся звенья A будут находиться в составе одиночных цепей. Уравнение (22.12) можно выразить через мольные доли звеньев, введенных в смесь

$$A = C_0 \left[\left(\chi_A^0 - \frac{\gamma}{1 - \gamma} \chi_U^0 \right) \varepsilon_A + \frac{1}{1 - \gamma} \chi_U^0 \varepsilon_X \right] \quad (22.13)$$

где первый член соответствует поглощению света свободными цепями $\text{poly}(\text{A})$, а второй — поглощению комплекса. Наличие множителя $1/(1 - \gamma)$ во втором члене связано с тем,

что на каждое звено U в комплексе приходится $\gamma/(1 - \gamma)$ звеньев A, что дает в сумме $1/(1 - \gamma)$ звеньев на звено U. Подставляя $(1 - \chi_A^0)$ вместо χ_U^0 в уравнение (22.13), получаем

$$A = C_0 \left(\frac{\epsilon_X - \gamma \epsilon_A}{1 - \gamma} + \chi_A^0 \frac{\epsilon_A - \epsilon_X}{1 - \gamma} \right) \quad (22.14)$$

Если в другом образце отношение $\chi_A^0 : \chi_U^0$ меньше, чем $\gamma : (1 - \gamma)$, то все A будут входить в состав комплексов, и останется некоторое количество свободных звеньев U. В этом случае, как следует из уравнения (22.12), поглощение образца будет равно

$$\begin{aligned} A &= C_0 \left[\left(\chi_U^0 - \frac{1 - \gamma}{\gamma} \chi_A^0 \right) \epsilon_U + \frac{1}{\gamma} \chi_A^0 \epsilon_X \right] \\ &= C_0 \left(\epsilon_U + \frac{\epsilon_X - \epsilon_U}{\gamma} \chi_A^0 \right) \end{aligned} \quad (22.15)$$

Основной момент, который следует подчеркнуть, состоит в том, что как в уравнении (22.14), так и в уравнении (22.15) поглощение является линейной функцией мольной доли звеньев A, введенных в смесь. Однако наклон зависимости поглощения от χ_A^0 различен с двух сторон от точки стехиометрической эквивалентности, если только по случайным причинам коэффициенты экстинкции трех компонентов не удовлетворяют соотношению

$$\epsilon_X = \gamma \epsilon_A + (1 - \gamma) \epsilon_U \quad (22.16)$$

На кривой смешивания такого прочного комплекса имеется точка, соответствующая соотношению компонентов, при котором наклон линейной зависимости поглощения от концентрации резко меняется. Эта точка отвечает соотношению компонентов в комплек-

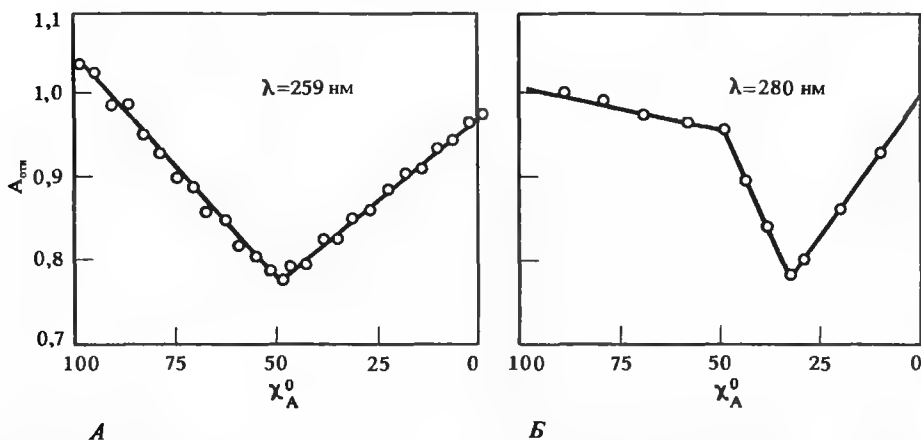
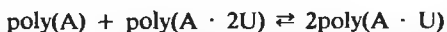


РИС. 22.13. Изменение поглощения при титровании $\text{poly}(A)$ раствором $\text{poly}(U)$. Представлена зависимость относительно поглощения от мольного состава смеси $\text{poly}(A) + \text{poly}(U)$ при постоянной суммарной концентрации полимеров. А. Зависимость A_{259} для условий, в которых образуется только комплекс $\text{poly}(A \cdot U)$ со стехиометрией 1:1. Б. Зависимость A_{280} для условий, в которых может образовываться как $\text{poly}(A \cdot 2U)$, так и $\text{poly}(A \cdot U)$. (По результатам, полученным Фельзенфельдом и др.)

се. Если образуется двойная спираль со стехиометрией 1:1, $\gamma = 0,5$, и резкое изменение наклона происходит при $\chi_A^0 = 0,5$. На рис. 22.13, А приведена экспериментальная кривая смешивания. Эта кривая показывает, что в смеси происходит реакция $\text{poly(A)} + \text{poly(U)} \rightarrow \text{poly(A} \cdot \text{U)}^1$. Если комплекс является достаточно прочным, но все же не бесконечно прочным, в точности те же рассуждения оказываются справедливыми в пределе большого избытка одного компонента над другим. Линейная экстраполяция в промежуточную область зависимости поглощения от концентрации, измеренной около $\chi_A^0 = 1$ и $\chi_A^0 = 0$, дает две прямые, которые пересекаются в точке стехиометрической эквивалентности. На экспериментальных графиках около точки излома наблюдается некоторое искривление из-за частичной диссоциации комплекса. Отметим, что поглощение $A_{\text{и}}$ в точке излома (или в точке, полученной путем экстраполяции), соответствует чистому комплексу. Это позволяет получить коэффициент экстинкции комплекса в расчете на моль звеньев, который равен просто $A_{\text{и}}/C_0$.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ОБРАЗОВАНИЯ ДВУХ- И ТРЕХЦЕПОЧЕЧНЫХ СТРУКТУР С ПОМОЩЬЮ КРИВЫХ СМЕШИВАНИЯ

Если два полимера могут образовывать комплексы с несколькими стехиометрическими соотношениями, получаются более сложные кривые смешивания. Например, при некоторых экспериментальных условиях poly(A) и poly(U) дают кривую смешивания, показанную на рис. 22.13, Б. На этой кривой имеются две точки излома: одна из них, при $\chi_A^0 = 0,5$, отвечает ожидаемой стехиометрии 1:1, а вторая, при $\chi_A^0 = 0,33$, соответствует структуре $\text{poly(A} \cdot 2\text{U)}$. Природа этой кривой смешивания объясняется следующим образом. До тех пор пока концентрация А превышает концентрацию U, образуется комплекс $\text{poly(A} \cdot \text{U)}$, а свободные цепи poly(U) остаются в растворе. Увеличение концентрации poly(A) выше $\chi_A^0 = 0,5$ приводит к реакции $\text{poly(A} \cdot \text{U)} + \text{poly(U)} \rightleftharpoons \text{poly(A} \cdot 2\text{U)}$. При $\chi_U^0 = 0,67$ все цепи poly(A) оказываются в составе тройной спирали $\text{poly(A} \cdot 2\text{U)}$, и при дальнейшем увеличении концентрации цепей poly(U) последние остаются в свободном виде в растворе. Отметим, что при $\chi_A^0 = 0,5$ кривая смешивания должна сглаживаться за счет реакции



Тот факт, что на кривой рис. 22.13, Б существует четко выраженная точка излома при $\chi_A^0 = 0,5$, означает, что равновесие при этих экспериментальных условиях сильно сминуто вправо.

Тройные спирали типа $\text{poly(A} \cdot 2\text{U)}$ — это довольно обычные структурные формы для гомополимерных комплексов. Комплексы с отношением спаренных оснований 2:1 часто встречаются в кристаллах мономеров или в их неводных растворах. На рис. 22.14 показаны схемы образования водородных связей для нескольких таких структур. Долгое время считалось, что подобные трехцепочечные комплексы почти не образуются из природных полимеров. Из-за постоянной геометрии связи между сахаром и парами А—Т или G—С регулярная двойная спираль может быть построена для любой произвольной последовательности ДНК, но трехцепочечные спиральные структуры смогут формироваться лишь для определенных троек оснований. Поэтому образование протяженных тройных спира-

¹ Следует сделать одно замечание относительно интерпретации кривой смешивания. Точка излома дает стехиометрическое отношение компонентов, а не их количество. Так, точка излома 0,5 может соответствовать структурам A_1U_1 , A_2U_2 и т.д. Принцип простоты («лезвие Оккама») диктует, что простейший состав должен рассматриваться как наиболее вероятный, если нет дополнительной информации о системе, требующей учета более сложных структур.

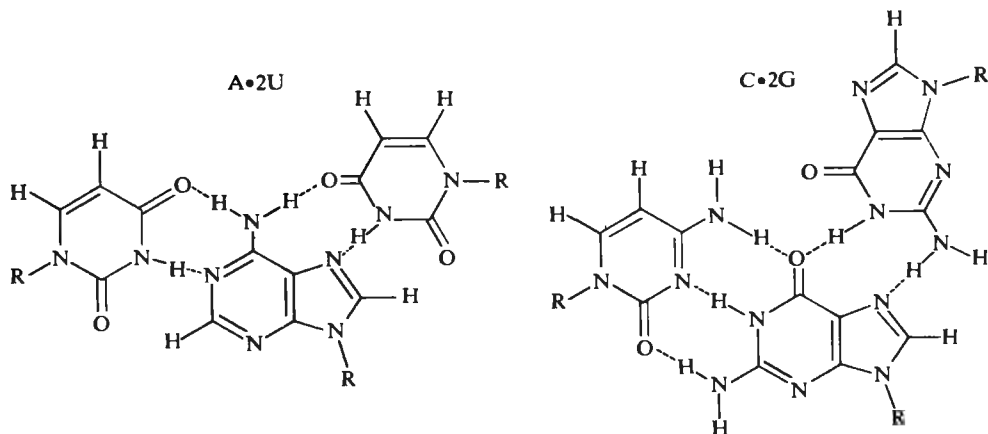


РИС. 22.14. Схемы спаривания оснований в $\text{poly}(A \cdot 2U)$ и $\text{poly}(C \cdot 2G)$. Следует отметить, что другие возможные (по крайней мере для мономерных комплексов) схемы для $A \cdot 2U$ могут быть получены поворотом одного из двух урацилов вокруг связи N^3-H . Подобным образом можно получить другие схемы и для второго комплекса.

лей, таких, как $\text{poly}(dA \cdot dT \cdot dT)$ (см. рис. 3.16), возможно лишь для немногих простых последовательностей ДНК или РНК. До тех пор пока нуклеиновые кислоты упрощенно считались строго регулярными структурами, короткие тройные спирали, которые могут образовываться отдельными последовательностями, не рассматривались всерьез.

Однако уже в самой первой нуклеиновой кислоте, чью третичную структуру удалось расшифровать, — в дрожжевой тРНК^{Phe} — было обнаружено несколько троек оснований, которые играют важную роль в формировании компактной жесткой конформации. Это открытие вновь повысило интерес к трехцепочечным модельным комплексам. Не исключено, что такие взаимодействия распространены в природных нуклеиновых кислотах гораздо шире, чем считалось раньше.

УСТОЙЧИВОСТЬ ГОМОПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ К ПОВЫШЕНИЮ ТЕМПЕРАТУРЫ

Двухцепочечные полинуклеотидные комплексы обычно настолько стабильны при комнатной температуре, что определить относительную прочность различных пар оснований довольно трудно. Чтобы выявить эти различия, необходимо дестабилизировать двойную спираль. Чаще всего при количественных исследованиях для этого повышают температуру. Поглощение раствора гомополимерного комплекса при изменении температуры резко возрастает при определенной для каждого комплекса температуре. Получаемая кривая плавления полностью обратима. Отметим, что при температурах, лежащих ниже области резкого перехода, поглощение образца остается постоянным, а при температурах выше этой области в некоторых случаях лишь слабо меняется. Из этого наблюдения как такового можно сделать вывод, что структура двойной спирали и одиночных цепей при этих температурах не меняется.

Как отмечалось выше, одиночные цепи меняют свои свойства с температурой. Однако температура плавления T_m двойной спирали столь высока, что происходит переход (приблизительно) двойная спираль $\rightarrow$ два неупорядоченных клубка (рис. 22.15, А). Двойные

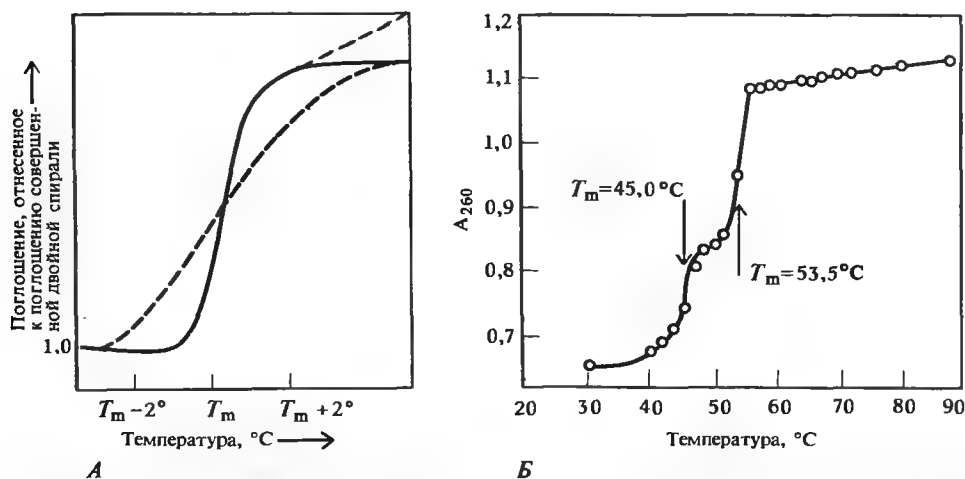
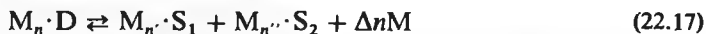


РИС. 22.15. Кривые плавления полинуклеотидов. А. Схематическое изображение кривых плавления природной ДНК (пунктирная кривая) и гомополинуклеотидной двойной спирали как для случая полного отсутствия стэкинга в одиночных цепях (сплошная кривая), так и для случая частичного сохранения стэкинга после плавления двойной спирали (цветная линия). Все кривые сдвинуты так, что температура плавления у них становится одинаковой, и нормированы к одинаковому максимальному изменению поглощения. Б. Двухступенчатое плавление $\text{poly}(\text{A} \cdot 2\text{U})$ с образованием $\text{poly}(\text{A} \cdot \text{U}) + \text{poly}(\text{U})$ при 45°C и последующим плавлением двойной спирали при $53,5^\circ\text{C}$. (Stevens C., Felsenfeld G., Biopolymers, 2, 293, 1964.)

спирали, которые плавятся при более низких температурах, распадаются на *частично упорядоченные* одиночные цепи, и при дальнейшем повышении температуры действительно наблюдается изменение поглощения. Отсутствие изменений поглощения в области ниже T_m также ни о чем не говорит. Как мы увидим ниже, двойная спираль ДНК не является неизменной статической структурой, однако поглощение оказывается нечувствительным к происходящим изменениям.

Наблюдаемая температура плавления для всех полинуклеотидных двойных спиралей сильно зависит от таких внешних параметров, как ионная сила, pH и природа растворителя. Этому есть простое термодинамическое объяснение. Любая малая или большая молекула М, которая по-разному связывается с одно- и двухцепочечными молекулами, будет изменять их температуру плавления. Мы можем представить равновесие превращения между двойной спиралью и одиночными цепями как



где М — малая молекула, S_1 и S_2 — одиночные цепи, D — двойная спираль. Согласно этой упрощенной схеме, при плавлении освобождается (или связывается, в зависимости от соотношения между n , n' и n'') $\Delta n = n - n' - n''$ молекул типа М. В действительности малые молекулы (ионы, протоны и т.д.) образуют облако вокруг полимера, что требует более детального описания, чем основанное на простом делении молекул на свободные и связанные, но здесь мы можем ограничиться таким упрощенным анализом. Используя это определение, запишем константу равновесия для образования спирали как¹

¹ Вообще говоря, проблема влияния посторонних соединений (лигандов, «скрепок» и т.д.) на плавление полинуклеотидов формулируется следующим образом. Пусть P — концентрация полиме-

$$K_{\text{сн}} = (M_n \cdot D) / (M_n \cdot S_1)(M_n \cdot S_2)(M)^{\Delta n} = \exp(-\Delta G^0/RT) \quad (22.18)$$

Зависимость от концентрации лигандов наиболее наглядно видна из соотношения

$$\partial(\ln K_{\text{сн}}) / \partial[\ln(M)] = -\Delta n \quad (22.19a)$$

На опыте, однако, обычно измеряется не $K_{\text{сн}}$, а T_m . Температурная зависимость $K_{\text{сн}}$ дается соотношением Вант-Гоффа. При $T = T_m$

$$\frac{\partial(\ln K_{\text{сн}})}{\partial T_m} = \frac{\partial}{\partial T_m} \left(\frac{-\Delta G^0}{RT_m} \right) = \frac{\Delta H^0}{RT_m^2} \quad (22.196)$$

в предположении, что изменения энтальпии ΔH^0 и энтропии реакции не зависят от температуры. Далее, полагая, что все переменные, кроме $\ln(M)$, от T не зависят, можно записать

$$\frac{\partial(\ln K_{\text{сн}})}{\partial T_m} = \frac{\partial(\ln K_{\text{сн}})}{\partial[\ln(M)]} \frac{\partial[\ln(M)]}{\partial T_m} \quad (22.19b)$$

Подставляя (22.196, в) в (22.19a), получаем простой результат:

$$\frac{\partial T_m}{\partial[\ln(M)]} = -\Delta n \frac{RT_m^2}{\Delta H^0} \quad (22.20a)$$

Величины ΔH^0 и Δn в уравнении (22.20a) относятся к кооперативной единице в процессе плавления. Поскольку эта величина, как правило, точно не известна, удобнее выразить данное соотношение через Δn_p — число освобождаемых молекул лиганда в расчете на фосфат, и ΔH_p^0 — изменение энтальпии в расчете на фосфат. В результате получим

$$\frac{\partial T_m}{\partial[\ln(M)]} = -\Delta n_p \frac{RT_m^2}{\Delta H_p^0} \quad (22.206)$$

Подчеркнем, что величина ΔH_p^0 в (22.206) является энтальпией образования спирали при температуре T_m ; она учитывает не только внутреннюю теплоту образования спирали, но и теплоту связывания или освобождения малых молекул. Внутренняя теплота ΔH_p спаривания оснований является большой по абсолютной величине отрицательной величиной и, как правило, вносит основной вклад в ΔH_p^0 . Поэтому из уравнения (22.206) следует, что

ра, представленная в виде концентрации фосфатных групп, r_1 — число пар оснований, приходящихся на одно место связывания лиганда в расплавленном полинуклеотиде, r_2 — в спиральном. Константы связывания с этими местами равны соответственно K_1 и K_2 . Пусть, наконец, M — суммарная концентрация молекул лиганда. Требуется определить, как зависит температура плавления и, вообще говоря, ширина интервала плавления полинуклеотида от введенных параметров. В такой постановке, а также в том или ином упрощенном варианте эта задача рассмотрена в книгах: Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика. — М.: Наука, 1975 (гл. 8), Волькенштейн М. В. Биофизика. — М.: Наука, 1981 (гл. 7) и в оригинальных работах: Франк-Каменецкий М. Д., Молек. биол., 2, 408, 1968; Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetskii M. D., Trifonov E. N., Biopolimers, 9, 1253, 1970; Франк-Каменецкий М. Д., Карапетян А. Т., Молек. биол., 6, 621, 1972.

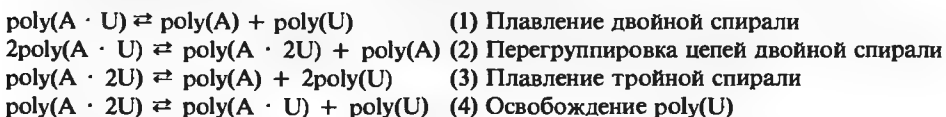
Уравнение (22.17) отвечает весьма специальному предельному случаю: $M \gg P$, $MK_1 \gg 1$, $MK_2 \gg 1$. Хотя вывод формулы (22.206) не представляется достаточно строгим, конечный результат правилен и совпадает с тем, который следует из общих формул работы Франк-Каменецкого и Карапетяна для данного предельного случая. При этом $\Delta n_p = 1/r_2 - 1/r_1$. — Прим. ред.

увеличение концентрации малых молекул будет увеличивать T_m , если эти молекулы охотнее связываются с двойной спиралью, чем с одиночными цепями ($\Delta l > 0$)¹. Если малые молекулы преимущественно связываются с одиночными цепями, будет наблюдаться уменьшение T_m . Существует большое число малых молекул, таких, как этидий и актиномицин D, которые связываются преимущественно с двухцепочечными структурами. Такие молекулы будут повышать температуру плавления T_m двойной спирали². Совершенно аналогичные рассуждения применимы для оценки влияния малых молекул на равновесие между двух- и трехцепочечными комплексами.

Некоторые белки тоже проявляют высокую избирательность при связывании, взаимодействуя или с одно-, или с двухцепочечными молекулами. В этом случае тоже можно определить их влияние на T_m при условии, что теплоты связывания белков не слишком велики и что сами они не денатурируют в исследуемой температурной области.

ФАЗОВЫЕ ДИАГРАММЫ ДЛЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

При наличии достаточного количества данных о температуре плавления и стехиометрии спиральных комплексов как функции внешних условий можно построить фазовую диаграмму состояний полинуклеотида. Такая диаграмма полезна в двух отношениях. Во-первых, экспериментатор может для проверки легко определить состояние системы для любых произвольных условий. Во-вторых, физические эффекты, ответственные за фазовые переходы, иногда можно легко оценить, исходя из поведения фазовых границ. Рассмотрим смесь $\text{poly}(\text{rA})$ и $\text{poly}(\text{rU})$. В этом случае существуют три основных параметра, влияющих на состояние системы: температура, концентрация соли и соотношение между компонентами смеси, и могут происходить четыре реакции:



Это означает, что при некоторых условиях в экспериментах по плавлению можно наблюдать два температурных перехода; например, тройная спираль может переходить в

¹ Делать подобного рода выводы на основе проведенного рассмотрения следует с большой осторожностью. Как вытекает из цитировавшейся выше работы Франк-Каменецкого и Карапетяна, в рассмотренном предельном случае полная формула для температуры плавления T_m выглядит следующим образом:

$$1/T_m = 1/T_0 + (R/\Delta H_p)[(1/r_1)\ln(K_2^-/K_1) + (1/r_2 - 1/r_1)\ln K_2 M]$$

где T_0 — температура плавления полинуклеотида в отсутствие лиганда. Из этой формулы видно, что знак сдвига температуры плавления полинуклеотида в присутствии данного лиганда относительно температуры плавления полинуклеотида без лиганда определяется не только величиной $\Delta H_p = 1/r_2 - 1/r_1$, но и соотношением констант связывания лиганда с полинуклеотидом в спиральном и расплавленном состояниях. — *Прим. ред.*

² На самом деле комплексы ДНК с указанными лигандами никогда не исследуются в условиях, отвечающих рассмотренному предельному случаю $M \gg P$. Реальной ситуации скорее отвечает предельный случай $PK_2 \gg 1$, $PK_1 \gg 1$, что приводит к совершенно другим выражениям для сдвига температуры плавления. Эти формулы можно найти в цитировавшихся выше работах. Они и используются для теоретического анализа влияния лигандов такого типа на плавление полинуклеотидов. См., например, работу Карапетяна А. Т., Пермогоров В. И., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Молек. биол., 6, 867, 1972. — *Прим. ред.*

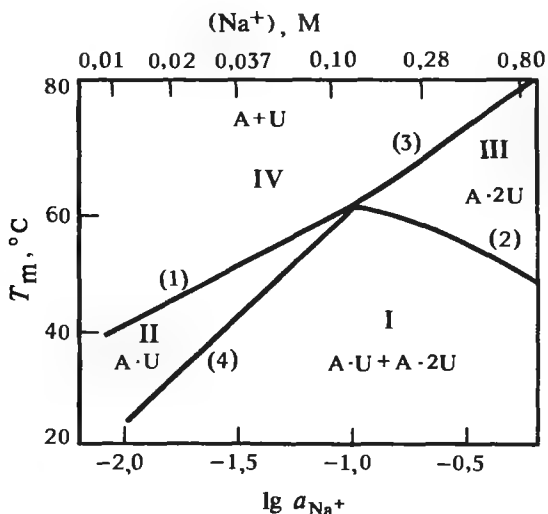


РИС. 22.16. Фазовая диаграмма для системы $\text{poly(A)} + \text{poly(U)}$ при нейтральных pH в отсутствие двухвалентных ионов. Представлена зависимость температуры плавления от концентрации ионов Na^+ . Влияние стехиометрии смеси для каждой из четырех областей описано в тексте. (Krakauer H., Sturtevant J., Biopolymers, 6, 491, 1968.)

двойную в ходе реакции 4, и затем (при другой температуре) двойная спираль может плавиться до одиночных цепей в ходе реакции 1; на рис. 22.15,Б приведена экспериментальная кривая плавления, соответствующая именно этой ситуации.

На рис. 22.16 представлена фазовая диаграмма, построенная для смеси $\text{poly(A)} + \text{poly(U)}$. Эта диаграмма была получена на основании данных по поглощению и большого числа прямых калориметрических экспериментов по переходам в спиральных молекулах. На диаграмме видны четыре отдельные фазовые области, разделенные линиями, каждая из которых соответствует одной из четырех приведенных выше реакций. Указаны только две переменные — температура и концентрация Na^+ . Для описания влияния относительных концентраций poly(A) и poly(U) необходимо построить трехмерную диаграмму. Однако влияние этого параметра не очень существенно, и его можно легко описать словами.

В области IV двойные и тройные спирали нестабильны. Как и следовало ожидать, эта область соответствует высоким температурам. При понижении концентрации соли она становится шире. Из приведенного выше простого термодинамического анализа следует, что все многоцепочечные структуры связывают больше ионов, чем одноцепочечные. Иначе говоря, образование двойных и тройных комплексов включает объединение двух или более сильно отрицательно заряженных полимерных цепей. Поэтому для преодоления электростатического отталкивания необходимо создать атмосферу с высокой концентрацией противоионов, и, следовательно, повышение концентрации соли уменьшает электростатическую свободную энергию образования комплексов [уравнение (22.4)].

В области II тройная спираль нестабильна из-за относительной легкости отделения poly(U) (реакция 4). Поэтому в этой области единственной многоцепочечной спиралью является $\text{poly(A} \cdot \text{U)}$. При любом стехиометрическом избытке poly(A) или poly(U) последние остаются в виде одиночных цепей. В области III двойная спираль нестабильна из-за перегруппировки цепей с образованием $\text{poly(A} \cdot 2\text{U})$ и poly(A) (реакция 2). Поэтому в этой области присутствует лишь комплекс $\text{poly(A} \cdot 2\text{U})$, а стехиометрический избыток poly(U) или poly(A) представлен одиночными цепями.

Описание области I более сложно. Здесь стабильны как $\text{poly(A} \cdot \text{U})$, так и $\text{poly(A} \cdot 2\text{U})$. Состояние системы является функцией соотношения между компонентами и описывается кривой смешивания, показанной на рис. 22.13,Б которая получена для условий, соответ-

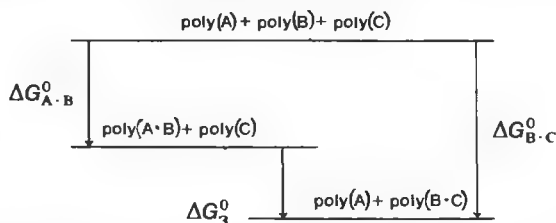
вующих области I. Если χ_U^0 меньше 0,5, в растворе присутствуют лишь двойная спираль $\text{poly}(\text{A} \cdot \text{U})$ и свободная $\text{poly}(\text{A})$. Для $0,5 \leq \chi_U^0 \leq 0,67$ в смеси будут находиться двойная и тройная спирали, причем в такой пропорции, чтобы в растворе не было свободных цепей. При $\chi_U^0 > 0,67$ существует лишь тройной комплекс и свободная $\text{poly}(\text{U})$. Проще всего объяснить эти результаты, предположив, что стабильность одноцепочечных форм значительно меньше, чем многоцепочечных. Поэтому образующиеся двойные и тройные спирали подчиняются требованию минимального количества одиночных цепей в растворе. Различия во внутренней свободной энергии между $\text{poly}(\text{A} \cdot 2\text{U})$ и $\text{poly}(\text{A} \cdot \text{U})$ пренебрежимо малы по сравнению с дополнительной энергией, связанной с существованием свободных одиночных цепей в этой области.

Будет ли наблюдаться температурный переход при пересечении границы фаз между областями I и II (T_{m4} , соответствующая реакция 4) или между областями I и III (T_{m2} , соответствующая реакции 2), зависит от соотношения между компонентами. Если в растворе существуют тройные комплексы, то при понижении ионной силы и переходе в область II они будут плавиться с образованием двойной спирали. Напротив, если существует двойная спираль, то при повышении ионной силы по достижении области III она будет перестраиваться в тройную спираль. Особенно интересна фазовая граница между областями I и III, поскольку производная $dT_{m2}/d[\ln(\text{Na}^+)]$ отрицательна. Это означает, что тройной комплекс и одиночная цепь вместе связывают больше ионов, чем два двухцепочечных комплекса. Это понятно, поскольку в тройном комплексе имеются три взаимодействия между фосфатами в каждой тройке звеньев (которые должны быть экранированы), тогда как в двойной спирали есть лишь одно такое взаимодействие. В соответствии с этим зависимость T_{m2} и T_{m3} (процессы с участием тройной спирали) от ионной силы оказывается сильнее, чем для T_{m1} , соответствующей обычному плавлению двойной спирали.

ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Весьма заманчиво связать стабильность спирали с такой легко измеряемой величиной, как T_m , и мы неявно делали это в предыдущем разделе. Однако относительные значения T_m не должны строго соответствовать относительной стабильности. Истинной мерой стабильности является свободная энергия G_s данного состояния s . Если все компоненты находятся в своих стандартных состояниях, можно использовать стандартные значения свободной энергии G_s^0 .

Равновесие для данной реакции определяется величиной ΔG^0 (а не ΔH^0 и не T_m). Для иллюстрации этого положения рассмотрим реакцию замещения цепей в спирали: $\text{poly}(\text{A} \cdot \text{B}) + \text{poly}(\text{C}) \rightleftharpoons \text{poly}(\text{A}) + \text{poly}(\text{B} \cdot \text{C})$. Энергия состояний этой гипотетической системы соответствует следующей схеме (в предположении, что $G_A^0 = G_B^0 = G_C^0$):



Предположим, что нам известны значения температуры плавления для процессов образования спиралей $\text{poly}(\text{A} \cdot \text{B})$ и $\text{poly}(\text{B} \cdot \text{C})$ из соответствующих компонентов, $T_{m(\text{A} \cdot \text{B})}$ и $T_{m(\text{B} \cdot \text{C})}$. Можно ли из этих данных оценить величину ΔG_3^0 , определяющую равновесие в реакции замещения? Используя соотношение $T_m = \Delta H^0 / \Delta S^0$, мы можем исключить одну

из этих двух термодинамических величин. Так, например,

$$\Delta G_{A \cdot B}^0 = \Delta H_{A \cdot B}^0 - T \Delta S_{A \cdot B}^0 = \Delta H_{A \cdot B}^0 (1 - T/T_{m(A \cdot B)}) \quad (22.21)$$

Аналогичное соотношение справедливо для $\Delta G_{B \cdot C}^0$. Поэтому ΔG_3^0 при температуре T равно

$$\begin{aligned} \Delta G_3^0 &= \Delta G_{B \cdot C}^0 - \Delta G_{A \cdot B}^0 \\ &= \Delta H_{B \cdot C}^0 - \Delta H_{A \cdot B}^0 + (\Delta H_{A \cdot B}^0/T_{m(A \cdot B)} - \Delta H_{B \cdot C}^0/T_{m(B \cdot C)})T \end{aligned} \quad (22.22a)$$

Оценить ΔG_3^0 с помощью уравнения (22.22a) невозможно, если неизвестны изменения энтальпий, а также T_m для плавления обоих двухцепочечных комплексов. Во многих случаях, однако, можно считать, что $\Delta H_{B \cdot C}^0 \cong \Delta H_{A \cdot B}^0 = \Delta H^0$. Тогда уравнение (22.22a) приобретает вид

$$\Delta G_3^0 = T \Delta H^0 (1/T_{m(A \cdot B)} - 1/T_{m(B \cdot C)}) \quad (22.22b)$$

Поскольку ΔH^0 отрицательно для всех известных реакций образования двойных спиралей, ΔG_3^0 отрицательно, если $T_{m(B \cdot C)} > T_{m(A \cdot B)}$. Двойная спираль с более высокой T_m всегда будет более предпочтительной в реакции замещения цепей. Это предсказание находится в хорошем согласии с экспериментом, как свидетельствуют приведенные в табл. 22.3 данные. Эти данные иллюстрируют также общую закономерность, состоящую в том, что двойные спирали РНК · РНК более стабильны, чем спирали ДНК · ДНК. Относительная стабильность гибридных спиралей РНК · ДНК не подчиняется столь простому правилу.

Приближение, которое было использовано нами для установления связи между ΔG_3^0 и T_m , имеет одно интересное следствие. Изменение энтальпии в термодинамическом цикле должно быть равно нулю. Поэтому, если равенство $\Delta H_{A \cdot B}^0 = \Delta H_{B \cdot C}^0$ выполняется строго, ΔH_3^0 также должно быть равно нулю, и, следовательно, в реакции замещения цепей не будет наблюдаться температурного перехода.

Если ΔH_3^0 не равно нулю, возможен другой подход. Из определенной экспериментально температуры плавления $T_{m(3)}$ для реакции замещения можно найти отношение $\Delta H_{B \cdot C}^0/\Delta H_{A \cdot B}^0$. Температура, при которой ΔG_3^0 обращается в нуль, равна $T_{m(3)}$. Поэтому из уравнения (22.22a) имеем

$$\Delta H_{B \cdot C}^0/\Delta H_{A \cdot B}^0 = (T_{m(3)}/T_{m(A \cdot B)} - 1)/(T_{m(3)}/T_{m(B \cdot C)} - 1) \quad (22.23)$$

Таблица 22.3

НАБЛЮДАЕМЫЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ,
УЧАСТВУЮЩИХ В РЕАКЦИЯХ ЗАМЕЩЕНИЯ ЦЕПЕЙ¹⁾

Реакция	T_m реагентов, °C	T_m продуктов, °C
poly(dI · dC) + poly(rI) → poly(dI) + poly(rI · dC)	46,1	52,3
poly(rI · dC) + poly(rC) → poly(dC) + poly(rI · rC)	52,3	60,2
poly(dI · rC) + poly(rI) → poly(dI) + poly(rI · rC)	35,4	60,2
poly(dI · rC) + poly(dC) → poly(rC) + poly(dI · dC)	35,4	46,1

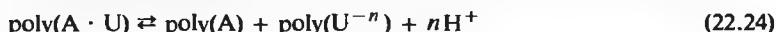
¹⁾ Chamberlin M. T., Patterson D. L., J. Mol. Biol., 12, 410, 1965.

Предположим, что нам известно изменение энтальпии для какой-то одной из трех приведенных на схеме реакций. Зная T_m , с помощью уравнения (22.23) мы можем оценить в этом случае все энтальпии (и, следовательно, свободные энергии). Таким образом, даже ограниченные термодинамические данные могут оказаться весьма полезными.

ВЛИЯНИЕ pH НА СТРУКТУРУ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

До сих пор мы рассматривали лишь такие внешние параметры, как ионная сила и температура. Влияние pH и органических растворителей является более сложным. Как было показано, ионная сила оказывает незначительное влияние на локальную структуру одиночных цепей, а изменение температуры приводит к столь плавным переходам, что ими можно, как правило, пренебречь. Однако существуют другие факторы, которые оказывают более ощутимое влияние на структуру одиночных цепей. Рассмотрим, в частности, влияние pH.

Увеличение pH выше 7 дестабилизирует двойную спираль и понижает температуру плавления. При щелочных pH у оснований U, T и G наблюдается отщепление протона (см. гл. 3); депротонированные основания не могут образовывать двойную спираль, поскольку именно эти отщепленные протоны должны были бы участвовать в образовании водородных связей. Например, при pH, соответствующих депротонированию одноцепочечной poly(U), образование двойной спирали poly(A · U) можно представить как



Сравнение этой реакции с реакцией (22.17) показывает, что в соответствии с уравнением (22.206) с увеличением pH двойная спираль становится менее стабильной¹.

Титрование кислотой тоже понижает температуру плавления полинуклеотидных двойных спиралей, но в некоторых случаях этот процесс оказывается более сложным. Как poly(A), так и poly(C) могут образовывать двухцепочечные протонированные спиральные структуры. На рис. 22.17 показаны пары оснований, образующиеся в этом случае. Особенно интересной является кислая форма poly(C), поскольку в образовании каждой пары оснований C—C участвует один протон. Наиболее прямо об этом свидетельствует кривая

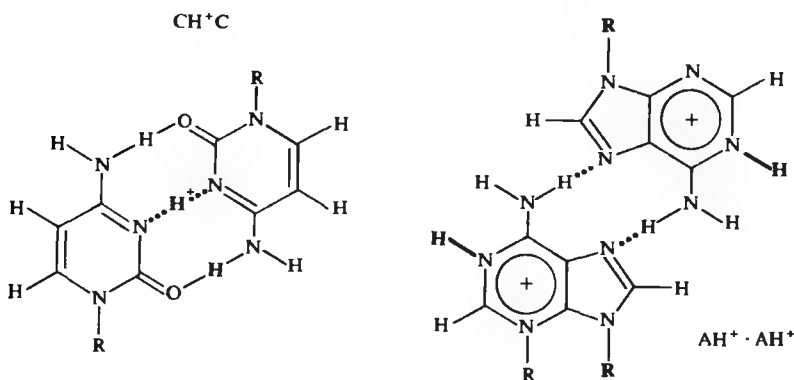


РИС. 22.17. Образование водородных связей между протонированными нуклеозидами.

¹ Отметим, что РНК (но не ДНК) легко гидролизруется в щелочи, так что реакция (22.24) может сопровождаться необратимым расщеплением цепей.

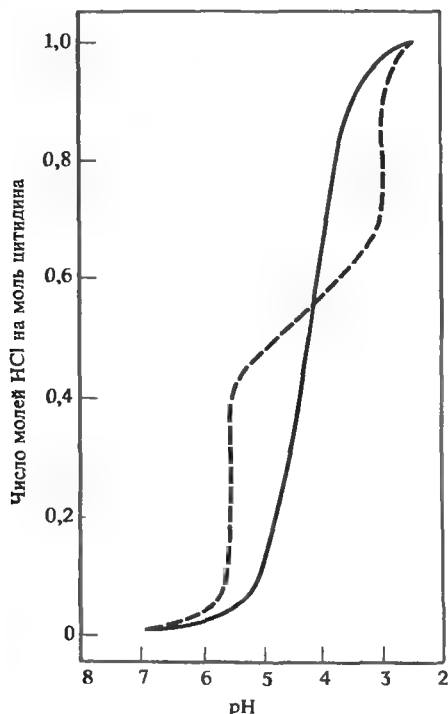


РИС. 22.18. Результаты кислотно-щелочного титрования цитидина и poly(C) в 0,1 M NaCl при 25°C. Цитидин (сплошная кривая) имеет лишь одно значение pK_a — при pH 4,3. У poly(C) (пунктирная кривая) наблюдаются два резких перехода при pH 5,7 и 3,0. Они соответствуют последовательным реакциям $2\text{poly}(\text{C} + \text{H}^+) \rightleftharpoons \text{poly}(\text{C} \cdot \text{H}^+ \cdot \text{C})$ и $\text{poly}(\text{C} \cdot \text{H}^+ \cdot \text{C}) + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2\text{poly}(\text{CH}^+)$ (осадок). (Hartman K., Rich A., J. Am. Chem. Soc., 87, 2033, 1965.)

титрования poly(C) (рис. 22.18). При отношении концентрации протонов к концентрации остатков цитозина, равном 1/2, наблюдается чрезвычайно резкий переход к кислой спиральной форме $\text{poly}(\text{C} - \text{H}^+ - \text{C})$. При добавлении большего количества протонов эта спираль дестабилизируется и дальнейшее титрование приводит в конце концов к образованию двух одноцепочечных, полностью протонированных структур $\text{poly}(\text{CH}^+)$. Кислая двойная спираль poly(A) также не является полностью протонированной формой. Однако протоны, связанные с poly(A), не вовлечены непосредственно в спаривание оснований. Кислая форма становится более стабильной, чем одноцепочечная, при концентрации протонов, значительно меньшей концентрации остатков A.

Электростатическое притяжение между положительно заряженными связанными протонами и отрицательно заряженными фосфатами должно стабилизировать кислую форму poly(A) и $\text{poly}(\text{C} - \text{H}^+ - \text{C})$. Чтобы проверить это, было исследовано влияние ионной силы на стабильность кислых форм при постоянном pH. Результаты таких опытов оказались совершенно неожиданными: как у poly(C), так и у poly(A) T_m при уменьшении концентрации соли увеличивалась, что в корне отличается от поведения обычных двойных спиралей. Это означает, что у кислых форм спиралей электростатическая свободная энергия способствует притяжению цепей, в то время как в случае обычных спиралей она вызывает их взаимное отталкивание. В действительности poly(C) и poly(A) могут образовывать кислые формы спиралей даже при pH 7, но в бессолевых растворах. Большой сдвиг кажущегося значения pK_a (от величины ~ 4 для мономера до ~ 7 для полимера) объясняется, таким образом, сопряжением титрования с образованием двойной спирали и стабилизацией протонированной формы двойной спирали, образованием водородных связей и электростатическими взаимодействиями с близлежащими фосфатными группами.

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛАВЛЕНИЯ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

При гидродинамических исследованиях плавления двойной спирали наблюдается более сложная картина, чем в случае применения оптических методов. На рис. 22.19 приведены два примера, которые иллюстрируют два совершенно разных явления. Плавление $\text{poly}[\text{d(AT)} \cdot \text{d(AT)}]$ и $\text{poly}[\text{dI} \cdot \text{d5BrC}]$, которое по данным исследования поглощения кажется полностью обратимым, при вискозиметрическом наблюдении характеризуется четко выраженным гистерезисом. Более того, у обоих образцов существенно изменяется вязкость при изменении температуры далеко за пределами той узкой области, где наблюдается переход по поглощению. Рис. 22.19,Б объясняет возможную природу этих эффектов. Исходная $\text{poly}[\text{d(AT)} \cdot \text{d(AT)}]$ образует при низких температурах регулярную двой-

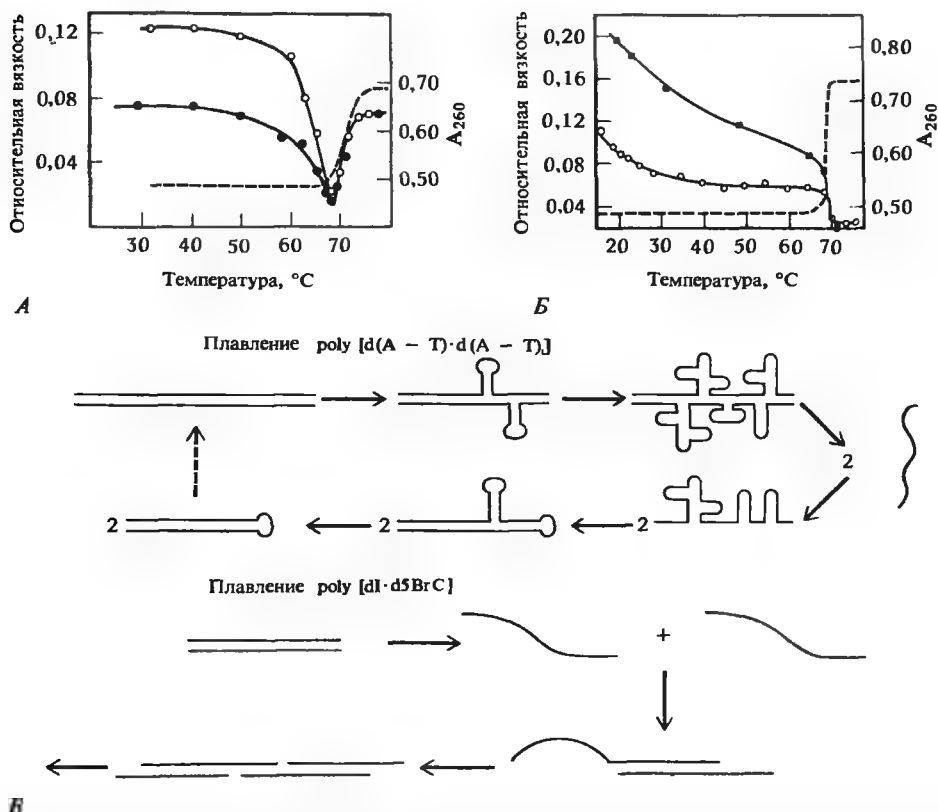


РИС. 22.19. Плавление полинуклеотидов, регистрируемое по поглощению (пунктирные кривые) и относительной вязкости (сплошные кривые). А. $\text{Poly}[\text{d(A-T)} \cdot \text{d(A-T)}]$. Точки указывают значения вязкости, полученные во время первого нагревания ($\circ$) и во время охлаждения и второго нагревания ($\bullet$). Б. $\text{Poly}[\text{dI} \cdot \text{d5BrC}]$. Точки указывают значения вязкости, полученные во время нагревания и охлаждения при температурах меньше 65°C ($\circ$), при нагревании до 80°C ($\bullet$) и при охлаждении от температуры, лежащей выше T_m ($\blacksquare$). Обратите внимание, что данные по поглощению совершенно не изменяются при повторении циклов нагревания и охлаждения, тогда как для вязкости характерен значительный гистерезис. (Inman R., Baldwin R., J. Mol. Biol., 2, 181, 1960 and 8, 452, 1964.) В. Схематическое изображение плавления и ренатурации.

ную спираль. При повышении температуры становится возможным выплавление очень небольших областей двойной спирали. Число разрушенных пар при этом слишком мало, чтобы его можно было зарегистрировать по изменению поглощения, но в расплавленных областях может происходить слипание цепи с образованием шпильчатых структур. Поскольку такие области содержат по нескольку неспаренных оснований, они характеризуются большей энтальпией, чем исходная двойная спираль. Однако число энергетически эквивалентных конформаций с несколькими шпильками очень велико. Статистический вес набора таких конфигураций оказывается выше, т.е. они обладают большей энтропией и, следовательно, могут иметь меньшую свободную энергию.

Вязкость очень чувствительна к изменениям линейных размеров объекта. Структуры, содержащие шпильки, оказываются значительно короче, что и объясняет заметное падение вязкости при повышении температуры до интервала плавления. Выше температуры плавления вязкость снова возрастает. Поскольку все пары оснований оказываются разрушенными, цепи расходятся и образуют два рыхлых клубка в отличие от глобулярного конденсированного кластера из шпилек, существовавшего ниже T_m . Отметим, что плато по вязкости, наблюдаемое при высоких температурах, в сильной степени зависит от ионной силы. При более низкой ионной силе существеннее становится электростатическое отталкивание отрицательных фосфатных групп в клубке. Этот эффект вызывает разбухание клубка, молекула становится более жесткой, и вязкость повышается. В пределе очень низких ионных сил можно ожидать, что клубок будет приближаться к палочкообразной конфигурации, поскольку именно у этой формы одноименно заряженной линейной молекулы электростатическая свободная энергия минимальна. Вязкость будет при этом близка к вязкости исходной двойной спирали.

Если препарат $\text{poly}[\text{d(AT)}]$, находящейся в виде клубка, охладить ниже T_m , внутрицепочечное спаривание оснований произойдет столь быстро, что два отдельных клубка вряд ли успеют образовать общую спираль и вязкость охлажденного раствора окажется значительно меньше, чем у исходной $\text{poly}[\text{d(AT)} \cdot \text{d(AT)}]$. Молекулярная масса у ренатурированного образца вдвое меньше, чем у исходного препарата. Две одноцепочечные шпильки имеют более высокую энергию, чем исходная форма, и должны были бы постепенно переходить в нее. Однако, если это и происходит, скорость процесса оказывается слишком малой для того, чтобы ее можно было измерить. Это вполне понятно, поскольку подобная перестройка должна характеризоваться очень высокой энергией активации, так как она сопряжена с необходимостью разрушения большого числа пар оснований для начала образования межцепочечного спаривания.

В $\text{poly}(\text{dI} \cdot \text{d5BrC})$ цепи не являются самокомплементарными и природа «предплавления» в этом случае значительно менее очевидна, чем для $\text{poly}[\text{d(AT)} \cdot \text{d(AT)}]$. Здесь шпильчатые структуры не могут быть стабилизированы спариванием оснований. Если расплавленную $\text{poly}(\text{dI} \cdot \text{d5BrC})$ поместить в ренатурирующие условия, охладив раствор ниже T_m , наблюдается значительно более сильная температурная зависимость вязкости, чем при нагревании исходного образца, а конечный низкотемпературный уровень оказывается значительно выше вязкости исходного препарата. Природа этого эффекта связана с агрегацией цепей (рис. 22.19, В). Как только температура становится ниже T_m , начинается образование двойных спиралей без приведения в соответствие комплементарных цепей по длинам. В каждой из таких попыток реализуется максимальная протяженность двойной спирали для заданного взаимного расположения комплементарных цепей, но в общем случае из-за несоответствия длин цепей при этом остаются одноцепочечные области. При температурах, лишь немного меньших T_m , протяженные одноцепочечные концы могут легко образовывать спиральные комплексы друг с другом. Более короткие концы не образуют комплексы при таких высоких температурах, поскольку, как мы увидим ниже, стабильность двойной спирали зависит от ее длины. Однако при дальнейшем понижении температуры все большее число концов оказывается способным к спариванию, что приво-

дит в среднем к образованию все более крупных агрегатов. Это вызывает непрерывное увеличение вязкости даже при температурах, лежащих значительно ниже T_m .

ЗАВИСИМОСТЬ СВОЙСТВ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК ОТ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА

Последние несколько примеров показывают, что использование систем с простыми последовательностями в качестве моделей имеет определенные недостатки. Высокая степень симметрии или гомогенность их последовательностей могут приводить к наличию у них свойств, которыми не обладают природные нуклеиновые кислоты. Поэтому имеет смысл сравнить свойства синтетических полинуклеотидов со свойствами природных нуклеиновых кислот. Начнем с природной ДНК. Поскольку обычно эта молекула представляет собой совершенную двойную спираль, ее поведение значительно проще, чем поведение большинства РНК.

Как правило, все природные ДНК состоят только из четырех обычных оснований — А, Т, С и G. В хорошем приближении можно считать, что любой препарат ДНК состоит из спиральных двухцепочечных молекул без разрывов цепей и без петель, и лишь на концах имеются небольшие нерегулярности. На самом деле, если не использовать чрезвычайные меры предосторожности, препарат будет состоять из фрагментов исходной хромосомной ДНК. За исключением небольших количеств ДНК с простой повторяющейся последовательностью, обычной для эукариот, последовательность среднего фрагмента ДНК в высшей степени асимметрична. Структура всех таких молекул ДНК близка к В-форме двойной спирали, наблюдаемой с помощью рентгеноструктурного анализа в волокнах при высокой влажности (см. гл. 3).

При сравнении средних свойств разных препаратов ДНК можно считать, что мы имеем дело с похожими в общих чертах структурами, различающимися лишь нуклеотидным составом и последовательностью оснований. При этом возникает естественный вопрос: можем ли мы объяснить все наблюдаемые различия в суммарных свойствах ДНК вариациями последовательности или состава? Пусть P — некая наблюдаемая характеристика препарата ДНК. В простейшем случае P будет зависеть лишь от свойств изолированных пар оснований. Если P_{AT} и P_{GC} — характеристики АТ- и GC-пар соответственно, то

$$P = f(P_{AT}, P_{GC}, \chi_{GC}) \quad (22.25)$$

где χ_{GC} — мольная доля GC-пар в данной ДНК. Для оптических свойств эта функция должна быть линейной, если данные свойства не зависят от последовательности:

$$P = \chi_{GC} P_{GC} + (1 - \chi_{GC}) P_{AT} = P_{AT} + (P_{GC} - P_{AT}) \chi_{GC} \quad (22.26)$$

Для других свойств функциональная зависимость может быть более сложной.

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА НА ТЕМПЕРАТУРУ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК И ЕЕ ПЛАВУЧУЮ ПЛОТНОСТЬ

Температура плавления двухцепочечных олигонуклеотидов зависит от последовательности, но для длинных гетерогенных ДНК влияние деталей последовательности почти полностью усредняется. Для того чтобы учесть влияние нуклеотидного состава на T_m , необходимо знать зависимость энтальпии ΔH^0 и энтропии ΔS^0 от мольной доли GC-пар. Пренебрегая влиянием последовательности на энтальпию и энтропию стэкинга, можно представить связь между этими величинами как

$$\Delta H_{GC}^0 = \Delta H_{AT}^0 (1 + h) \quad (22.27a)$$

$$\Delta S_{GC}^0 = \Delta S_{AT}^0 (1 + y) \quad (22.27b)$$

где h и y малы, поскольку, наблюдаемое различие в термодинамических параметрах АТ- и GC-пар невелико. Тогда общее изменение энтальпии и энтропии при плавлении в расчете на звено можно найти с помощью уравнения (22.26):

$$\Delta H^0 = \Delta H_{\text{АТ}}^0(1 - \chi_{\text{GC}}) + \Delta H_{\text{АТ}}^0(1 + h)\chi_{\text{GC}} = \Delta H_{\text{АТ}}^0(1 + h\chi_{\text{GC}}) \quad (22.28a)$$

$$\Delta S^0 = \Delta S_{\text{АТ}}^0(1 - \chi_{\text{GC}}) + \Delta S_{\text{АТ}}^0(1 + y)\chi_{\text{GC}} = \Delta S_{\text{АТ}}^0(1 + y\chi_{\text{GC}}) \quad (22.28b)$$

Используя определение $T_m = \Delta H^0/\Delta S^0$, справедливое для достаточно длинных полимеров, температуру плавления ДНК можно выразить как

$$T_m = \frac{\Delta H_{\text{АТ}}^0}{\Delta S_{\text{АТ}}^0} \left(\frac{1 + h\chi_{\text{GC}}}{1 + y\chi_{\text{GC}}} \right) \cong T_{m(\text{АТ})} [1 + (h - y)\chi_{\text{GC}}] \quad (22.29)$$

поскольку $1/(1 + y\chi_{\text{GC}}) \cong 1 - y\chi_{\text{GC}}$, если $y\chi_{\text{GC}}$ мало. Из уравнения (22.29) следует, что зависимость температуры плавления от GC-содержания должна быть линейной. Экспериментальные данные, полученные для природных ДНК, находятся в хорошем согласии с этим выводом (рис. 22.20). Параметры уравнения (22.29) можно оценить, исходя из анализа экспериментальных данных (для 0,15 М раствора NaCl):

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 69,3 + 41\chi_{\text{GC}} \quad (22.30)$$

Значения параметров $T_{m(\text{АТ})}$ и $h - y$ зависят от внешних условий, таких, как тип и количество соли в растворе и рН. Интересно, что существуют условия, при которых

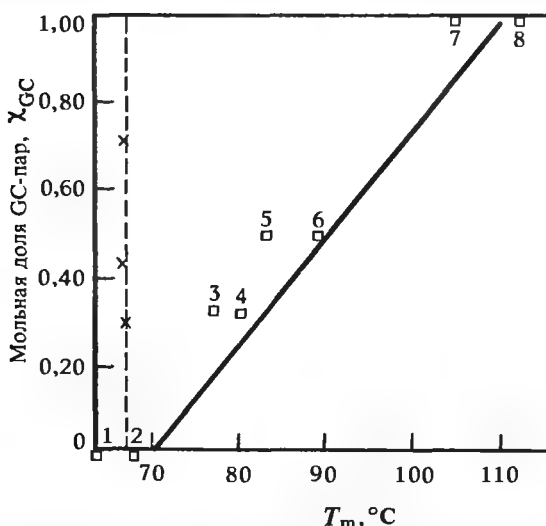


РИС. 22.20. Зависимость температуры плавления от нуклеотидного состава. Сплошная прямая — зависимость полученной экспериментально температуры плавления ряда природных ДНК от мольной доли GC-пар; 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрата натрия. Приведены также значения T_m для нескольких синтетических полинуклеотидов при сравнимых условиях: (1) $d(A-T) \cdot d(A-T)$; (2) $dA \cdot dT$; (3) $d(T-A-C) \cdot d(G-T-A)$; (4) $d(A-T-C) \cdot d(G-A-T)$; (5) $d(T-C) \cdot d(G-A)$; (6) $d(T-G) \cdot d(C-A)$; (7) $dG \cdot dC$; (8) $d(G-C) \cdot d(G-C)$. Крестики — температура плавления трех ДНК при совершенно иных условиях: в 2,36 М растворе хлористого тетраэтиламмония; в этом случае T_m перестает зависеть от нуклеотидного состава ДНК (пунктирная прямая). (Wells R. et al., J. Mol. Biol., 54, 465, 1970; Melchior W. B., von Hippel P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 295, 1973.)

$h - y = 0$. Зависимость T_m от χ_{GC} для таких условий — 2,36 М раствор хлористого тетраэтиламмония — также приведена на рис. 22.20. При еще более высоких концентрациях этой соли $dT_m/d\chi_{GC}$ становится отрицательной, так что ДНК с более высоким GC-содержанием плавится при более низких температурах.

Зависимость температуры плавления синтетических ДНК с регулярными периодически-последовательностями от GC-содержания не подчиняется уравнению (22.29). Это расхождение связано с зависимостью энтальпии и энтропии перехода от последовательности, которая в этом случае не усредняется.

Еще одним параметром, характеризующим двухцепочечную ДНК, является плавучая плотность в растворе CsCl, ρ_0 . Этот параметр зависит от удельного парциального объема и гидратации ДНК. Эмпирически было установлено (рис. 22.21), что зависимость плавучей плотности большинства природных ДНК от GC-содержания подчиняется уравнению

$$\rho_0(\text{г} \cdot \text{см}^{-3}) = 1,660 + 0,098\chi_{GC} \quad (22.31)$$

Из этого уравнения следует, что ДНК с разным нуклеотидным составом можно разделить путем центрифугирования в растворе CsCl. Эта методика оказывается очень полезной при анализе относительных количеств ДНК с разным нуклеотидным составом. Она используется также при очистке ДНК от примесей, однако из-за того, что коэффициент перед χ_{GC} мал, полностью разделить ДНК с очень близким GC-содержанием трудно.

Для многих ДНК уравнение (22.31) не выполняется (см. рис. 22.21). Эти исключения весьма интересны. Синтетические ДНК с регулярными периодически-последовательностями имеют аномальную плавучую плотность, поскольку в них реализуются лишь вполне определенные типы взаимодействий между соседними парами. Значительные отклонения от уравнения (22.31) наблюдаются и для ДНК ряда бактериофагов. Это связано с наличием в таких ДНК необычных оснований, например 5-гидроксиметилцитозина, который замещает цитозин. Таким образом, измерение плавучей плотности является чувствительным методом выявления необычных составляющих в ДНК.

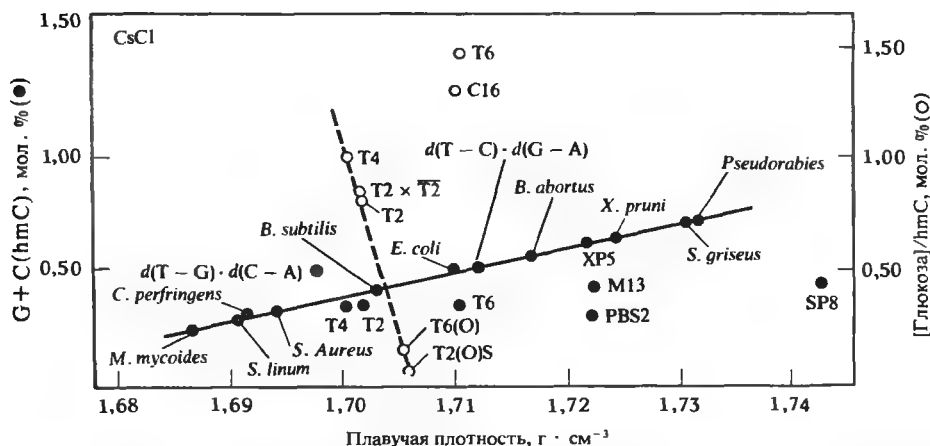


РИС. 22.21. Зависимость плавучей плотности нативной ДНК в растворе CsCl при 25°C от нуклеотидного состава. По левой оси ординат отложена мольная доля Г и С (или аналогов С), по правой — относительное содержание глюкозы в расчете на один остаток гидроксиметилцитозина для ДНК Т-четных бактериофагов (○). (Szybalski W. In: Procedures in Nucleic Acid Research, vol. 2, ed. G. L. Cantoni and D. R. Davies, New York, Harper and Row, 1971, p. 311.)

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВАНИЙ НА СВОЙСТВА ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

Простейший способ учета влияния нуклеотидной последовательности на свойства ДНК основан на предположении, что главную роль играют взаимодействия ближайших соседей. В антипараллельной двойной спирали ДНК существует десять типов контактов, соответствующих таким взаимодействиям:

A-A	A-T	T-A	A-G	G-A	A-C	C-A	G-C	C-G	G-G
· ·	· ·	· ·	· ·	· ·	· ·	· ·	· ·	· ·	· ·
T-T	T-A	A-T	T-C	C-T	T-G	G-T	C-G	G-C	C-C

При анализе любого наблюдаемого свойства P можно выразить его через свойства отдельных типов контактов P_i ($1 \leq i \leq 10$) и мольные доли χ_i каждого типа межплоскостного контакта в рассматриваемой ДНК. Для достаточно длинного полимера, в котором можно пренебречь влиянием концов, эти десять мольных долей не являются независимыми переменными. Так, для ДНК с антипараллельными цепями существуют два дополнительных ограничения на возможные значения χ_i . Если рассматривать одновременно обе цепи ДНК, χ_i удовлетворяют условиям

$$\chi_{AT} + \chi_{AC} + \chi_{AG} = \chi_{TA} + \chi_{CA} + \chi_{GA} \quad (22.32)$$

$$\chi_{GA} + \chi_{GC} + \chi_{GT} = \chi_{AG} + \chi_{CG} + \chi_{TG} \quad (22.33)$$

где через χ_{AT} , например, обозначена мольная доля контактов $A(3' \rightarrow 5')T$. Уравнение (22.32) просто означает, что любой блок из звеньев А с обоих концов граничит с основаниями, отличными от А. Уравнение (22.33) соответствует эквивалентному условию для блоков из звеньев Г.

Эти ограничения означают, что для описания наблюдаемых данных необходимы только восемь мольных долей χ_i и внутренние свойства лишь восьми контактов P_i . Или, что более существенно, из экспериментальных данных можно извлечь только восемь линейно независимых параметров. Это все еще очень большое число параметров, и довольно редко удается найти какое-нибудь измеряемое свойство системы, для описания которого целесообразно было бы использовать восемь параметров. Исключение составляют спектры КД, которые очень чувствительны к последовательности. Спектры КД ДНК сравнительно хорошо описываются уравнением

$$[\theta] = \sum_{i=1}^8 \theta'_i \chi'_i \quad (22.34)$$

где θ'_i и χ'_i являются линейными комбинациями свойств и частот встречаемости десяти основных контактов. Эти комбинации можно найти, исследуя модельные ДНК с известной последовательностью оснований.

Для других свойств достаточно использовать значительно более простой аналог уравнения (22.34). Например, для вполне адекватного описания изменения коэффициента экстинкции при плавлении ДНК можно объединить десять величин, соответствующих различным ближайшим соседям, в три группы. Пусть $\Delta\epsilon_{AT}$ — среднее значение $\Delta\epsilon$ для трех возможных типов взаимодействий с участием только А и Т; $\Delta\epsilon_{GC}$ — среднее для трех типов взаимодействий с участием Г и С, а $\Delta\epsilon_{AG}$ — среднее для четырех возможных типов взаимодействий между АТ- и GC-парами. Предположим далее, что частоты встречаемости различных ближайших соседей случайны. Тогда мольная доля каждой из этих трех групп как функция GC-содержания ДНК равна просто $(1 - \chi_{GC})^2$, χ_{GC}^2 и $2\chi_{GC}(1 - \chi_{GC})$. Величина $\Delta\epsilon$ для плавления рассматриваемой ДНК равна

$$\begin{aligned} \Delta\epsilon &= (1 - \chi_{GC})^2 \Delta\epsilon_{AT} + 2\chi_{GC}(1 - \chi_{GC}) \Delta\epsilon_{AG} + \chi_{GC}^2 \Delta\epsilon_{GC} \\ &= \Delta\epsilon_{AT} + 2\chi_{GC}(\Delta\epsilon_{AG} - \Delta\epsilon_{AT}) + \chi_{GC}^2(\Delta\epsilon_{AT} + \Delta\epsilon_{GC} - 2\Delta\epsilon_{AG}) \end{aligned} \quad (22.35)$$

Из этого уравнения следует, что изменение поглощения должно быть квадратичной функцией мольной доли GC-пар. На самом деле для большинства длин волн $\Delta\epsilon_{AT} + \Delta\epsilon_{GC} \equiv \Delta\epsilon_{AG}$. В результате квадратичный член становится равным нулю и уравнение (22.35) сводится к

$$\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_{AT} + \chi_{GC} (\Delta\epsilon_{GC} - \Delta\epsilon_{AT}) \quad (22.36)$$

Последнее выражение в точности соответствует уравнению (22.26), в котором влияние последовательности не учитывалось.

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

В случае щелочных катионов влияние ионной силы на стабильность двойной спирали почти не зависит от нуклеотидного состава или последовательности оснований природных ДНК. Как видно из рис. 22.22, T_m есть линейная функция логарифма суммарной концентрации соли (C_c). Наклон соответствующей прямой практически не зависит от нуклеотидного состава, и в широкой области значений C_c и χ_{GC} экспериментальные данные описываются уравнением

$$T_m = 16,6 \lg C_c + 41 \chi_{GC} + 81,5 \quad (22.37)$$

Интересно сравнить это уравнение с уравнением (22.206), где мы попытались объяснить влияние соли различиями в связывании катионов с двойной спиралью и с одиночными цепями. Из (22.206) следует, что T_m^{-1} определяется соотношением $a \lg C_c + b$, где a и b — константы. Данные, приведенные на рис. 22.22, охватывают на самом деле сравнительно узкую область абсолютных температур, в которой линейные изменения T_m^{-1} соответствуют почти линейным изменениям T_m . Таким образом, эти два уравнения не противоречат друг другу.

Простая теория, которая приводит к уравнению (22.206), вполне подходит для качественного объяснения влияния ионной силы на плавление полинуклеотидов, но для количественного анализа она не годится. Ниже мы рассмотрим в общих чертах современную теорию полиэлектролитов и покажем, как она применяется к анализу плавления полинуклеотидов.

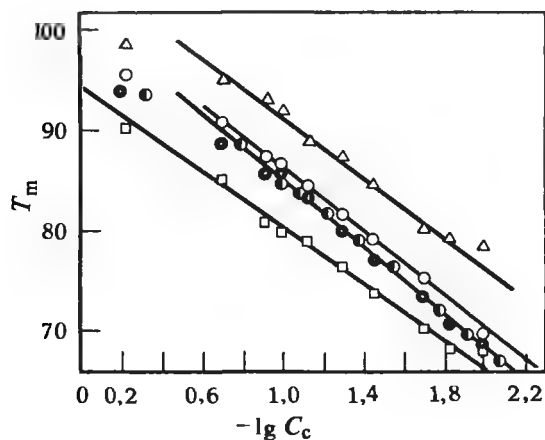


РИС. 22.22. Зависимость температуры плавления ДНК от концентрации соли. $\square$ — ДНК *D. pneumoniae* в KCl, $\circ$ — ДНК *E. coli* в KCl, Δ — ДНК *Ps. aeruginosa* в KCl, $\bullet$ — ДНК *E. coli* в натрий-фосфатном буфере, $\odot$ — ДНК *E. coli* в натрий-цитратном буфере. Отклонение от линейности при высокой концентрации соли является достоверным. На самом деле при еще более высоких концентрациях соли T_m может даже уменьшаться. (Shildkraut C., Lifson S., Biopolymers, 3, 195, 1968.)

Некоторые ДНК с регулярными периодическими последовательностями проявляют аномальную зависимость температуры плавления от ионной силы. Хотя линейная зависимость T_m от $\lg C_s$ сохраняется, некоторые полинуклеотиды, такие, как $\text{poly}[\text{d}(\text{T}-\text{G}) \cdot \text{d}(\text{C}-\text{A})]$ и $\text{poly}[\text{d}(\text{A}-\text{T}-\text{C}) \cdot \text{d}(\text{G}-\text{A}-\text{T})]$, оказываются значительно менее чувствительными к ионной силе. Объяснения этому факту пока не найдено. Возможно, эти конкретные последовательности более эффективно связывают противоионы, находясь в одноцепочечном состоянии, а может быть, структура некоторых из них отличается от обычной¹.

● ТЕРМОДИНАМИКА ЛИНЕЙНЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ

Удобной моделью нуклеиновой кислоты является бесконечный линейный набор отрицательных зарядов, находящихся друг от друга в среднем на расстоянии b . Для жесткой двойной спирали b измеряется вдоль оси спирали, для более гибких цепей — вдоль контура цепи.

Чтобы понять природу влияния ионного окружения на свойства нуклеиновых кислот, мы должны рассмотреть два явления. Первое [описываемое приближенно уравнением (22.4)] представляет собой электростатическое экранирование цепи атмосферой противоионов. Второе отвечает непосредственному связыванию (конденсации) противоионов с нуклеиновой кислотой.

Мы сначала рассмотрим связывание противоионов, а затем используем полученные результаты для более строгого описания экранирования атмосферой противоионов. Конденсация противоионов определяется безразмерным параметром ξ , который равен

$$\xi \equiv e^2/\epsilon k T b \quad (22.38)$$

где e — заряд электрона, ϵ — диэлектрическая постоянная растворителя, k и T — постоянная Больцмана и абсолютная температура соответственно. Отметим, что при 25°C в воде величина $e^2/\epsilon k T$ равна 7,14 Å. Мэннинг (G. Manning) показал, что при $\xi < 1$ конденсация противоионов на полимере не происходит, а при $\xi > 1$ противоионы конденсируются, причем количество связанных противоионов не зависит от ионной силы. Отношение числа конденсированных противоионов к заряду полимера равно

$$\theta_M = 1 - \xi^{-1} \quad (22.39)$$

В В-форме двойной спирали ДНК на каждые 3,4 Å приходится одна пара оснований (или два фосфата). Отсюда следует, что $b = 1,7$ Å, а $\xi = 7,14/1,7 = 4,2$. Это означает, что в данном случае должна происходить конденсация противоионов, и величина θ_M равна 0,76. Экспериментальные измерения θ_M были выполнены методом ЯМР с использованием ^{23}Na . Было получено значение $0,75 \pm 0,1$, что находится в прекрасном согласии с предсказанием теории.

¹ Например, М. Висвамитра (M. A. Viswamitra) определил кристаллическую структуру pdApdTpdpApdT и показал, что последовательность 5'-АТ рассматриваемого тетрамера спаривается с последовательностью 3'-АТ одного тетрамера, а его последовательность 3'-АТ — с 5'-АТ другого тетрамера. Расположенные в середине основания Т и А при этом не участвуют в стэкинге. Структуру одного тетрамера можно схематически представить как . Является ли образование такой структуры просто следствием концевых эффектов в коротких олигонуклеотидах или оно связано с некоторыми необычными свойствами последовательности АТАТ — пока неясно. Как бы то ни было, это наблюдение подчеркивает тот важный факт, что при исследовании природных ДНК большинством методов регистрируется результат довольно грубого усреднения локальных свойств. Эти методы могут не чувствовать локальные изменения структуры, которые, возможно, играют крайне важную биологическую роль.

Даже после конденсации противоионов молекулы нуклеиновых кислот все еще представляют собой сильно заряженные полиэлектролиты. На каждом фосфате остается не нейтрализованный отрицательный заряд $1 - \theta_M$. Поскольку $1 - \theta_M = \xi^{-1} = b/7,14$, на каждые 7,14 Å приходится один отрицательный заряд. Эти заряды экранируются, в свою очередь, атмосферой противоионов. Мы можем оценить экранирование с помощью уравнения (22.4), подставив в него оставшийся заряд $e(1 - \theta_M)$ вместо заряда электрона e . Наиболее удобно вычислять электростатическую свободную энергию в расчете на моль фосфатов:

$$G_{эл} = \frac{N_0}{z} \frac{e^2(1 - \theta_M)^2}{\epsilon} \sum_{l=1}^z \sum_{k \neq l}^z \frac{1}{2} \exp[-(\kappa|l - k|b)] / |l - k|b \quad (22.40)$$

Как нетрудно показать, при больших z двойная сумма равна¹ $-(z/b) \ln[1 - \exp(-\kappa b)]$. Предшествующий сумме член может быть переписан как $(N_0/z)(bkT\xi)\xi^{-2} = bRT\xi^{-1}z^{-1}$. При этом мы получаем особенно простой результат:

$$G_{эл} = -RT\xi^{-1} \ln[1 - \exp(-\kappa b)] \quad (22.41)$$

Наиболее интересным является случай, когда $\kappa b \ll 1$; при этом экспоненту можно разложить в ряд, что приводит к еще более простому результату:

$$G_{эл} = -RT\xi^{-1} \ln \kappa b \quad (22.42)$$

При увеличении ионной силы параметр экранировки Дебая — Хюккеля растет как $(M)^{1/2}$, где (M) — молярная концентрация катионов. При этом κb приближается к единице, член $\ln \kappa b$ растет, оставаясь отрицательным, а величина $G_{эл}$ уменьшается. Это естественно, поскольку электростатическое отталкивание становится меньше. Отметим, что величина этого отталкивания определяется параметром ξ^{-1} , остаточным зарядом на каждом фосфате. Таким образом, экранирование является более важным для одноцепочечных полинуклеотидов, чем для двухцепочечных, поскольку остаточный заряд после конденсации противоионов значительно выше для одиночных цепей (0,60 на фосфат), чем для двойной спирали (0,24 на фосфат).

● ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА ПЛАВЛЕНИЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Здесь мы получим общее соотношение, описывающее влияние лигандов на плавление полинуклеотидов, и используем его для анализа случая, когда наблюдается избыток моновалентных катионов M и уравнение (22.206) становится неточным. Обозначим через D

¹ Это является прекрасным упражнением для читателя, имеющего склонности к математическим занятиям. Прежде всего, нужно отметить, что в сумме среди $z(z-1)/2$ членов содержится $z-1$ член, соответствующий взаимодействию ближайших соседей, т.е. взаимодействию зарядов, разделенных расстоянием b , $z-2$ членов, соответствующих зарядам, которые отстоят друг от друга на расстояние $2b$ и т.д. Если привести подобные члены, двойная сумма может быть переписана как

$$(1/b) \sum_j (z-j) \exp[-(j\kappa b)] / j$$

где суммирование проводится от $j=1$ до $j=z-1$. Получающаяся сумма может быть выражена через сумму членов геометрической прогрессии или интеграл от геометрической прогрессии.

двойную спираль нуклеиновой кислоты, а через S_1 и S_2 — две одиночные цепи. Наблюдаемая константа равновесия для образования двойной спирали равна

$$K_{\text{набл}} = (D)/(S_1)(S_2) \quad \text{или} \quad \Delta G_{\text{набл}} = -RT \ln K_{\text{набл}} \quad (22.43)$$

Истинная константа равновесия, учитывающая начальное и конечное состояния в процессе плавления $S_1^{(0)} + S_2^{(0)} + \Delta n M \rightleftharpoons D^{(0)}$, равна

$$K_{\text{ист}}^{(0)} = (D^{(0)})/(S_1^{(0)})(S_2^{(0)})(M)^{\Delta n} \quad \text{или} \quad \Delta G_{\text{ист}}^{(0)} = -RT \ln K_{\text{ист}}^{(0)} \quad (22.44)$$

где индекс (0) обозначает исходные состояния цепей, а Δn — стехиометрическое число противоионов, захваченных при образовании двойной спирали (или, что эквивалентно, стехиометрическое число противоионов, высвободившихся при плавлении). Обычно удобно выбрать в качестве исходного состояния форму с большим числом конденсированных противоионов.

Различие между $K_{\text{набл}}$ и $K_{\text{ист}}^{(0)}$ обусловлено двумя факторами: изменением свободной энергии ΔG_k , связанным с конденсацией противоионов, и разностью $\Delta G_{\text{эл}}$ электростатической энергии с учетом противоионного экранирования для двухцепочечных и одноцепочечных форм. Рассмотрим двойную спираль (или кооперативно плавящийся двухцепочечный сегмент), включающую z фосфатов. Из изложенной в предыдущем разделе теории полиэлектролитов следует, что число связанных противоионов для двойной спирали и одиночных цепей равно $z(1 - \xi_D^{-1})$ и $z(1 - \xi_S^{-1})$ соответственно. Таким образом, стехиометрическое число захваченных противоионов при образовании двойной спирали равно $\Delta n = z(\xi_S^{-1} - \xi_D^{-1})$. Если концентрация противоионов во время плавления равна (M) , результирующее изменение свободной энергии равно

$$\Delta G_k/RT = -z(\xi_S^{-1} - \xi_D^{-1}) \ln(M) \quad (22.45)$$

Вклад экранирования в свободную энергию плавления дается уравнением (22.42). Для двойной спирали с z фосфатами

$$\Delta G_{\text{эл}}/RT = -z(\xi_D^{-1} \ln \kappa b_D - \xi_S^{-1} \ln \kappa b_S) \quad (22.46)$$

где b_S и b_D — расстояние между соседними фосфатами в одиночной цепи и в двойной спирали соответственно, а κ — параметр экранировки Дебая — Хюккеля. Как отмечалось выше, для моновалентного электролита параметр κ равен $0,33(M)^{1/2}$, так что $\Delta G_{\text{эл}}/RT$ равно

$$\Delta G_{\text{эл}}/RT = -(z/2)(\xi_D^{-1} - \xi_S^{-1}) \ln(M) - z(\xi_D^{-1} \ln 0,33b_D - \xi_S^{-1} \ln 0,33b_S) \quad (22.47)$$

Объединяя $\Delta G_k/RT$ и $\Delta G_{\text{эл}}/RT$, мы можем записать

$$\begin{aligned} \ln K_{\text{набл}} &= \ln K_{\text{ист}}^{(0)} + \Delta G_k/RT + \Delta G_{\text{эл}}/RT \\ &= \ln K_{\text{ист}}^{(0)} - (z/2)(\xi_S^{-1} - \xi_D^{-1}) \ln(M) - z(\xi_D^{-1} \ln 0,33b_D - \xi_S^{-1} \ln 0,33b_S) \end{aligned} \quad (22.48)$$

Таким образом, влияние концентрации соли на наблюдаемую константу равновесия определяется соотношением

$$\partial(\ln K_{\text{набл}})/\partial[\ln(M)] = -(z/2)(\xi_S^{-1} - \xi_D^{-1}) = -\Delta n/2 \quad (22.49)$$

Заметим, что это равно в точности половине эффекта, предсказываемого более простой теорией [уравнение (22.19a)]. При более строгом рассмотрении необходимо учитывать неидеальность раствора, но этот эффект довольно мал для типичных условий исследования ДНК. Если уравнение (22.49) использовать вместо уравнения (22.19a), мы можем переписать уравнение (22.20a) как

$$\partial T_m / \partial [\ln(M)] = -(\Delta n / 2)(RT_m^2 / \Delta H^0) \quad (22.50a)$$

И опять здесь получается вдвое меньшая величина, чем следует из простой теории. Физическую причину этого довольно легко объяснить. Согласно закону действующих масс, соль будет благоприятствовать образованию той формы, которая более охотно ее связывает (двойной спирали). Влияние же электростатического экранирования будет менее существенным для этой формы, поскольку в ней меньше остаточных зарядов. Таким образом, связывание ионов и экранирование оказывают противоположное влияние, причем первый эффект преобладает.

В общем случае Δn и ΔH^0 относятся к кооперативной единице в процессе плавления. Поскольку часто ее размер точно не известен, удобно выразить все через параметры в расчете на один фосфат. Обозначим соответствующее изменение энтальпии через ΔH_p^0 и будем считать, что $\xi_S^{-1} - \xi_D^{-1}$ отвечает стехиометрическому числу захваченных противоионов в расчете на фосфат. Обозначив эту величину как $\Delta \xi^{-1}$, мы можем записать

$$\partial T_m / \partial [\ln(M)] = -(\Delta \xi^{-1} / 2)(RT_m^2 / \Delta H_p^0) \quad (22.50b)$$

Интегрирование этого выражения от некоторых реперных значений температуры плавления $T_m^{(0)}$ и концентрации соли ($M^{(0)}$) до экспериментальных значений T_m и (M) дает

$$1/T_m = 1/T_m^{(0)} - (R\Delta \xi / 2\Delta H_p^0) \ln(M^{(0)}) + (R\Delta \xi^{-1} / 2\Delta H_p^0) \ln(M) \quad (22.51)$$

Это соотношение показывает, что в действительности величина $1/T_m$ должна меняться линейно с изменением $\ln(M)$, но экспериментальные данные обычно находятся в столь узкой области абсолютных температур, что линейная шкала для $1/T_m$ оказывается почти линейной и для T_m . Таким образом, теория полиэлектролитов прекрасно объясняет наблюдаемую зависимость температуры плавления ДНК от концентрации соли.

● ПРИМЕНЕНИЯ ТЕОРИИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ

Уравнение (22.50b) можно использовать различными способами. Например, для ДНК фага T4 величина $RT_m^2 / \Delta H_p^0$ измерена калориметрически и равна -50 град; величина $\partial T_m / \partial [\ln(\text{Na}^+)]$ равна 8,9. Таким образом, на основании уравнения (22.50b) мы можем получить

$$\Delta \xi^{-1} = -2(\Delta H_p^0 / RT_m^2) \partial T_m / \partial [\ln(\text{Na}^+)] = 0,36 \quad (22.52)$$

Поскольку $\xi_D^{-1} = 0,24$ (см. предыдущий раздел), мы получаем для ξ_S^{-1} значение 0,60. Это позволяет оценить среднее расстояние между фосфатами в одиночной цепи. Так как $\xi_S = 1,7$, мы все еще находимся в области конденсации противоионов. Из уравнения (22.39) получаем, что доля конденсированных зарядов в расчете на фосфат равна 0,40. Теперь, используя уравнение (22.31), находим, что b (среднее расстояние между соседними фосфатами в одиночной цепи) равно 4,3 Å.

В качестве второго примера рассмотрим фазовую диаграмму на рис. 22.16, описывающую состояние системы в зависимости от температуры и концентрации Na^+ для poly(A)

Таблица 22.4

ЗАВИСИМОСТЬ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛИ^{1),2)}

Переход	$\partial T_m / \partial [\ln(\text{Na}^+)]$	$RT_m^2 / \Delta H_p^0$	$\Delta \xi^{-1}$
$\text{poly(A)} + \text{poly(U)} \rightleftharpoons \text{poly(A} \cdot \text{U)}$	8,5	- 55	0,32
$\text{poly(A)} + 2\text{poly(U)} \rightleftharpoons \text{poly(A} \cdot \text{U}_2)$	11,3	- 54	0,44
$\text{poly(A} \cdot \text{U)} + \text{poly(U)} \rightleftharpoons \text{poly(A} \cdot \text{U}_2)$	15,6	- 159	0,20
$\text{poly(A} \cdot \text{U}_2) + \text{poly(A)} \rightleftharpoons 2\text{poly(A} \cdot \text{U)}$	-6,5	- 230	-0,06

¹⁾ Record M. T. et al., Quart. Rev. Biophys., 11, 103, 1978.²⁾ ΔH_p^0 — энтальпия образования двойной спирали в расчете на фосфат, $\Delta \xi^{-1}$ отвечает числу захваченных протвионов в расчете на фосфат.

и poly(U) . Зависимость различных переходов в этой системе от концентрации соли суммирована в табл. 22.4. На основании измеренных значений $\partial T_m / \partial [\ln(\text{Na}^+)]$ и $RT_m^2 / \Delta H_p^0$ можно оценить $\Delta \xi^{-1}$ для каждого перехода.

С другой стороны, поскольку структура $\text{poly(A} \cdot \text{U)}$ и $\text{poly(A} \cdot 2\text{U)}$ известна из рентгеноструктурных исследований волокон, мы можем оценить расстояние между фосфатами: $b_{A \cdot U} = 1,5 \text{ \AA}$ и $b_{A \cdot 2U} = 1,0 \text{ \AA}$. Подставив эти значения в уравнение (22.38), мы найдем, что $\xi_{A \cdot U}^{-1} = 0,22$ и $\xi_{A \cdot 2U}^{-1} = 0,15$. Эти результаты, а также данные табл. 22.4 позволяют вычислить остаточные заряды и размеры цепи для изолированных poly(A) и poly(U) .

Напомним, что $\Delta \xi^{-1}$ соответствует стехиометрическому числу захваченных при переходе ионов в расчете на фосфат. Таким образом, для реакции $\text{poly(U)} + \text{poly(A} \cdot \text{U)} \rightleftharpoons \text{poly(A} \cdot 2\text{U)}$ справедливо соотношение

$$\Delta \xi^{-1} = (1/3)\xi_U^{-1} + (2/3)\xi_{A \cdot U}^{-1} - \xi_{A \cdot 2U}^{-1} \quad (22.53)$$

Из этого уравнения находим, что $\xi_U^{-1} = 0,61$. Аналогично для реакции $\text{poly(A)} + \text{poly(U)} \rightleftharpoons \text{poly(A} \cdot \text{U)}$ получаем, что ξ_A^{-1} равно 0,46. Эти результаты соответствуют значениям $b_A = 3,3 \text{ \AA}$ и $b_U = 4,3 \text{ \AA}$. Таким образом, poly(U) очень близка по своей структуре к типичной одноцепочечной деацетирированной ДНК, в то время как poly(A) имеет существенно более компактную структуру со средним расстоянием между фосфатами, не слишком превышающим величину, которую следует ожидать для одиочной цепи в составе двойной спирали.

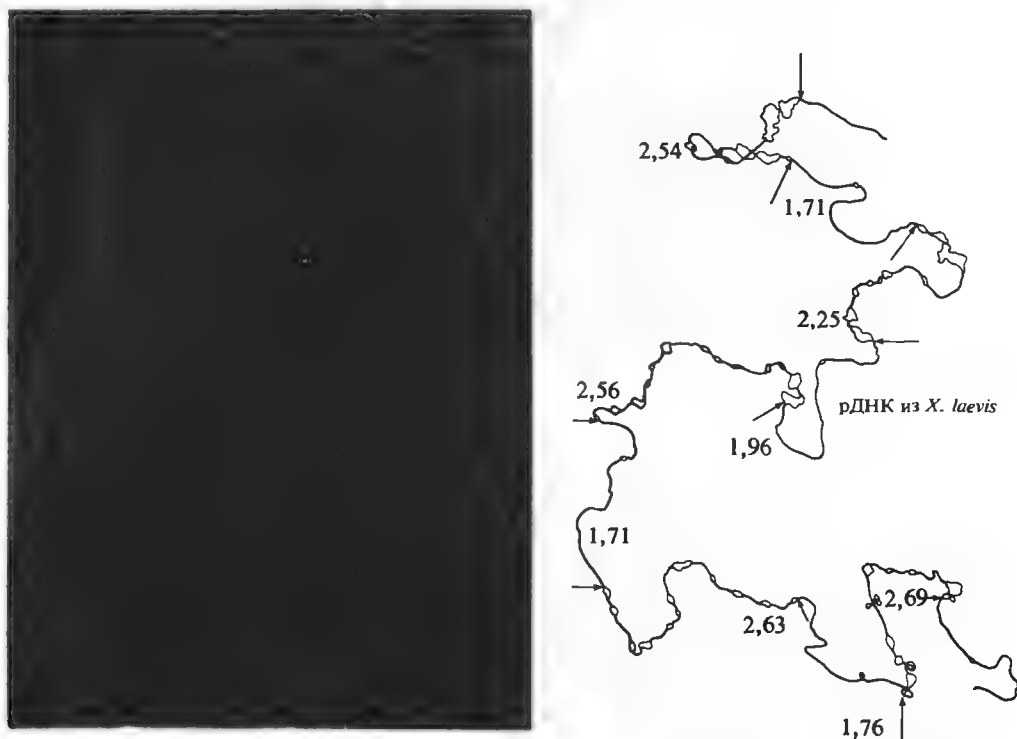
ФОРМА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ДНК

Кривые плавления синтетических полинуклеотидов с регулярными периодическими последовательностями являются очень крутыми: доля звеньев, находящихся в спиральном состоянии, может уменьшаться от 0,75 до 0,25 в интервале 1°C или меньше. Напротив, интервал плавления природных ДНК оказывается весьма широким (см. рис. 22.15,4). Объяснение этому эффекту дает уравнение (22.30). Температура плавления полинуклеотида настолько чувствительна к нуклеотидному составу, что локальные флуктуации в χ_{GC} приводят к появлению областей с разными T_m . Поскольку взаимодействие между этими областями распространяется лишь на ограниченную длину, отдельные участки плавятся независимо друг от друга. Таким образом, модель перехода по принципу «все или ничего» не справедлива для плавления ДНК.

Четкие данные о независимости плавления отдельных участков ДНК были получены Рейчем и др. (E. Reich et al.), которые использовали различные имеющиеся в их распоря-

Более адекватное рассмотрение плавления ДНК было проведено Крозерсом (D. Crothers). Его результаты показывают, что при приближении к T_m в ДНК появляются денатурированные участки в областях с наиболее высоким АТ-содержанием. При дальнейшем повышении температуры становится энергетически выгодным слияние таких денатурированных участков путем выплавления областей между ними. Расчеты дают ширину интервала плавления, характерную для типичных природных ДНК. Наблюдаемая ширина зависит, однако, от ионной силы. Этот эффект является более сложным и, несомненно, связан с электростатической свободной энергией расплавленных областей. Из-за того что две одиночные цепи в таких областях должны быть сближены на концах, где они переходят в участки двойной спирали, $G_{пл}$ не совпадает ни с энергией изолированных цепей, ни с энергией двухцепочечного комплекса. Она является сложной функцией длины этих областей.

Если в ДНК имеются уникальные области с низкой температурной стабильностью, их можно выявить, зафиксировав частично расплавленное состояние и блокировав ренатурацию. Элегантный вариант такого подхода представляет электронно-микроскопическое картирование денатурированных областей. Метод наиболее эффективен для уникальных



А

РИС. 22.24. Использование электронной микроскопии для анализа последовательности рибосомной ДНК и РНК из *Xenopus laevis*.

А. Денатурационная карта одной молекулы рДНК. Частично денатурированная ДНК была получена путем добавления щелочи. После фиксации расплавленных участков формальдегидом препарат был приготовлен для электронно-микроскопического анализа по методу Кляйншмита. На рисунке воспроизведена картина чередования легкоплавких и более стабильных участков.

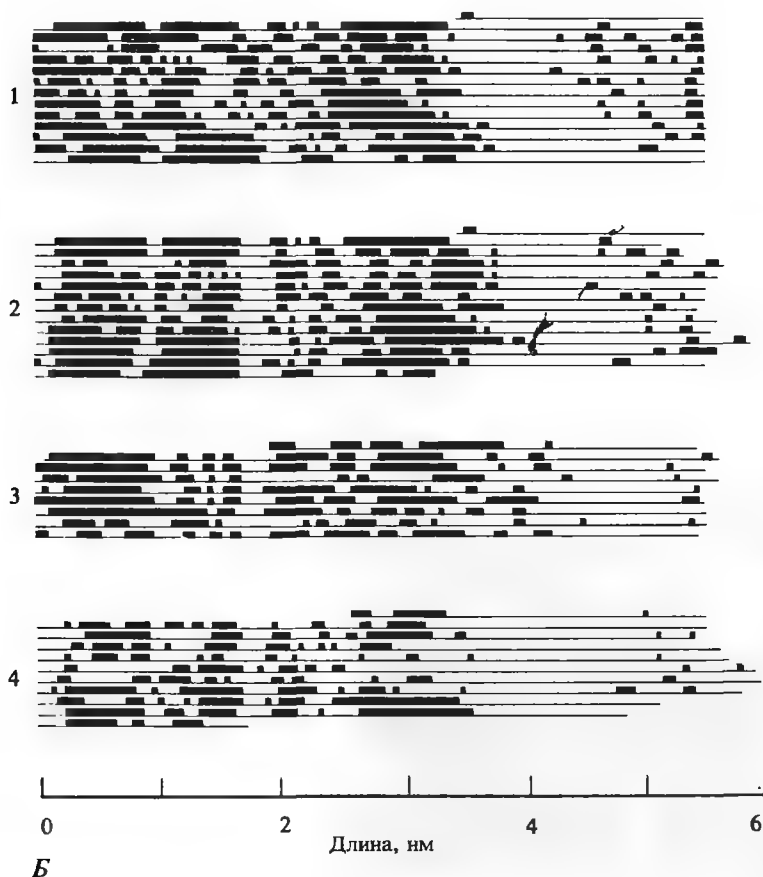
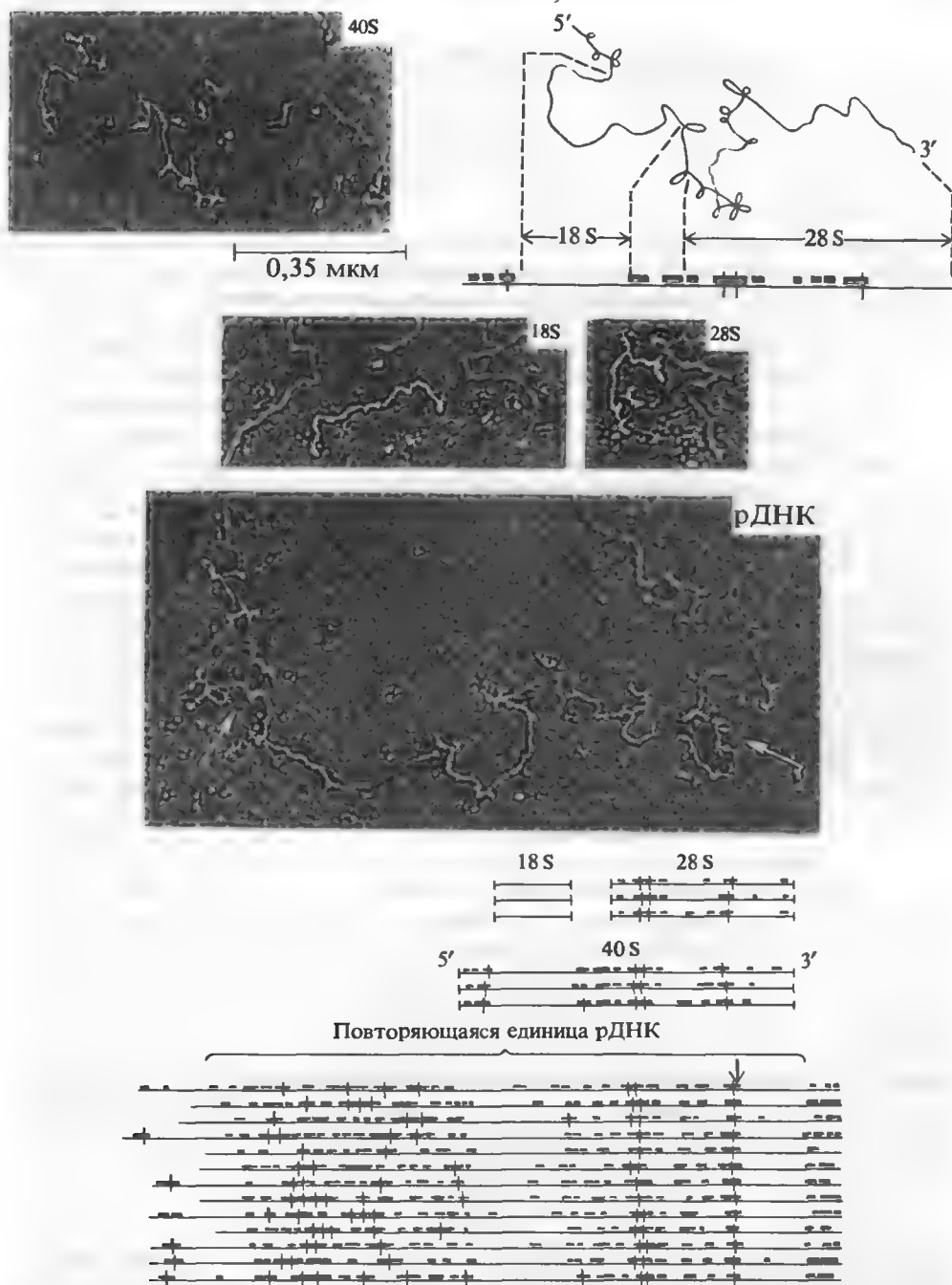


Рис. 22.24 (продолжение).

Б. Денатурационные карты для нескольких молекул ДНК; молекула, приведенная в части А, представлена диаграммой 1. Каждая линия соответствует одному повтору расплавленных и спиральных участков и каждая последующая линия является продолжением предыдущей. Жирные полосы соответствуют расплавленным областям. Такая же молекула представлена диаграммой 2, но в ней повторяющиеся участки выстроены друг под другом. Эта молекула оказалась наиболее регулярной из всех исследованных. Молекула 3 является «средней по качеству», а для молекулы 4 получилась наименее регулярная денатурационная карта. Обратите внимание, что при выстраивании повторяющихся участков друг под другом проявляется тонкая структура стабильных и нестабильных областей. Более стабильные области имеют повышенное GC-содержание. Каждый повтор транскрибируется в 40S-предшественника рРНК, из которого в конце концов вырезается 18S- и 28S-рРНК.

В. Карты вторичной структуры рРНК и рДНК, полученные для препаратов, обработанных формальдегидом. На микрофотографии с пометкой «40S» видна молекула 40S-предшественника рРНК. На схематическом изображении молекулы приведены символы, используемые для обозначения одиночных петель (полоски) и сложных петель (полоски, перечеркнутые вертикальной линией). На микрофотографиях с пометками «18S» и «28S» видно по одной молекуле 18S- и 28S-рРНК. На микрофотографии с пометкой «рДНК» представлен фрагмент одноцепочечной рДНК. Область, заключенная между стрелками, — это одна транскрипционная единица для одного 40S-предшественника рРНК. Области, находящиеся вне указанного участка, представляют собой обогащенные GC-парами не-транскрибируемые участки, которые соответствуют стабильным областям повторов, показанных в части А и Б данного рисунка. Приведены схематические карты вторичной структуры для трех молекул 18S-рРНК, трех 28S-рРНК и трех 40S-рРНК. Важно отметить, что схемы вторичной структуры



позволяют установить локализацию 18S- и 28S-рРНК на 40S-предшественнике. На схематической карте вторичной структуры участка рДНК показаны повторяющиеся области, которые кодируют 40S-РНК (первая сложная петля в 28S-области указана стрелкой) и GC-богатую стабильную область (левая часть повторяющейся единицы со сложной вторичной структурой). Рисунки А и Б заимствованы из работы Wensink P. C., Brown D. D., J. Mol. Biol., **60**, 235, 1971; рисунок В представлен P. Wellauer.)

(не содержащих повторов) цепей ДНК. Это могут быть или целые вирусные ДНК, или отдельные фракции ДНК эукариот, например повторяющиеся рибосомные гены. ДНК подвергают частичной денатурации (во многих случаях с помощью щелочи, а не путем нагревания), а затем добавляют формальдегид. Формальдегид преимущественно реагирует с аминогруппами неспаренных оснований, блокируя ренатурацию расплавленных областей при нейтрализации или охлаждении раствора ДНК и последующем изучении цепей под электронным микроскопом.

Для надежной идентификации положения расплавленных областей необходимо исследовать большое число молекул. Дело в том, что плавление индивидуальных участков происходит в конечном интервале рН или температуры и занимает конечное время. Взаимодействие с формальдегидом также является многостадийным процессом. Поэтому у индивидуальных молекул, наблюдаемых под электронным микроскопом, расположение одноцепочечных петель (или схлопнувшихся петель с образованием глобулярных или разветвленных структур), разделенных двухцепочечными участками, будет различаться. На рис. 22.24,А показана одна из таких молекул — фрагмент ДНК из *Xenopus laevis*. Для локализации структур, соответствующих расплавленным областям, измеряется расстояние от концов, причем эта процедура повторяется для большого числа молекул. Внутреннего способа отличить один конец молекулы от другого не существует, однако некоторые рельефные особенности расположения денатурированных областей оказываются, как правило, достаточно асимметричными для того, чтобы различить концы молекулы. Затем для всех изученных образцов строят прямолинейные схемы расположения денатурированных областей и путем сопоставления различных молекул выявляют главные черты денатурационных карт (рис. 22.24,Б). Такие карты являются важной индивидуальной характеристикой ДНК и используются в различных биохимических и генетических исследованиях.

Денатурационное картирование близко к картированию вторичной структуры. Последнее пока находит применение в основном при исследовании РНК, но может с успехом использоваться и для одиночных цепей ДНК. При картировании вторичной структуры выявляются не самые первые выплавляемые области, а те участки, которые плавятся в последнюю очередь. Они выглядят как шпильки или более сложные ветвистые структуры на фоне расплавленной одноцепочечной молекулы РНК. В идеальном случае наиболее стабильная область вторичной структуры РНК должна соответствовать наиболее стабильной области двойной спирали ДНК, которая кодирует эту РНК. Температура — не совсем подходящий параметр для картирования вторичной структуры вследствие кооперативности последних этапов температурного плавления и из-за слишком сильной реакционной способности формальдегида при температурах выше T_m . Более подходящими оказываются денатурирующие органические растворители, и большинство работ было выполнено с использованием водных растворов формамида.

На рис. 22.24,В приведен пример структурного картирования рибосомных ДНК и РНК из *Xenopus laevis*. Сопоставление данных, полученных для РНК и ДНК, позволяет определить область ДНК, кодирующую предшественник 40S-рРНК, а также области, которые кодируют зрелые 18S- и 28S-рРНК¹.

¹ В изучении внутримолекулярного плавления ДНК в последние годы достигнут значительный прогресс как в плане теории, так и в плане эксперимента. Эти новые результаты частично отражены в учебнике: Волькенштейн М. В. Биофизика (гл. 7), — М.: Наука, 1981. Укажем также обзоры: Лазуркин Ю. С. Молек. биол., 11, 1311, 1977; Wada A., Yabuki S., Husimi Y., CRC Critical Rev. Biochem., 9, 87, 1980 и важные работы: Borovik A. S., Kalambet Y. A., Lyubchenko Y. L., Shitov U. M., Golovanov E. I., Nucleic Acids Res., 8, 4165, 1980; Perelroyzen M. P., Lyamichev V. I., Kalambet Y. A., Lyubchenko Y. L., Vologodskii A. V., Nucleic Acids Res., 9, 4043, 1981. — Прим. ред.

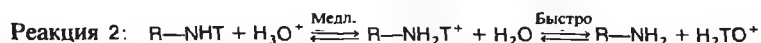
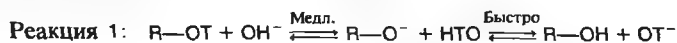
22.4. Флуктуации и изменения структуры двойной спирали

Электронная микроскопия является чрезвычайно мощным методом; она позволяет получить значительно более детальную картину плавления, чем другие методы исследования ДНК в растворе. Однако этот метод дает лишь статическую картину состояния ДНК. В то же время представляет интерес анализ флуктуационных раскрытий участков двойной спирали при температурах, лежащих значительно ниже T_m . Хотя исследование поведения ДНК при температурах, значительно превышающих 37° , может пролить свет на ее функционирование *in vivo*, все же а priori ценность информации, полученной для этих условий, неясна, поскольку нас прежде всего интересует поведение ДНК при физиологических температурах.

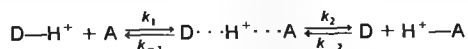
Наиболее эффективными методами анализа конформационных флуктуаций является химическая модификация и изотопный обмен. Последний оказывается особенно удобным, поскольку в ходе самого обмена не вносятся заметных изменений в исследуемую структуру. Здесь мы рассмотрим лишь некоторые применения тритиевого обмена. Общая идея таких методов состоит в том, что более экспонированные звенья быстрее обмениваются химически идентичными протонами, чем менее экспонированные.

СКОРОСТЬ ТРИТИЕВОГО ОБМЕНА ЭКСПОНИРОВАННЫХ ПРОТОНОВ

В принципе можно измерять как скорость замещения атомов водорода на ^3H в макромолекуле, не содержащей первоначально ^3H , так и скорость замещения ^3H на ^1H в молекуле, в которой ранее произошел тритиевый обмен. Вследствие кинетического изотопного эффекта эти две скорости не должны совпадать. В малых молекулах может происходить обмен любого протона, который успевает вступить в реакцию ионизации за время эксперимента. Например,



В каждом из этих случаев лимитирующая стадия представляет собой реакцию переноса протона:



где D — донор протона, A — акцептор. В реакции 1 $\text{D}-\text{H}^+$ соответствует $\text{R}-\text{OH}$, в реакции 2 — H_3O^+ .

Такие реакции переноса протона всесторонне исследованы. В большинстве случаев их кинетика описывается следующей моделью. Столкновение протона донора с акцептором происходит со скоростью, лимитируемой диффузией, так что $k_1 \cong 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Во всех интересующих нас случаях обратным обменом можно пренебречь и, следовательно, считать, что k_{-2} мала. Для объяснения наблюдаемых скоростей нам нужно найти долю столкновений, которая приводит к переносу протона. При этом используется тот факт, что перенос протона в тройном комплексе $\text{D} \cdots \text{H}^+ \cdots \text{A}$ происходит столь быстро, что протон оказывается в равновесии относительно связывания с D или A. Скорость обмена будет определяться, таким образом, долей α комплексов, в которых протон связан с акцептором.

Прочность связывания протона с донором и акцептором характеризуется константами

кислотной диссоциации:

$$K_a = (H^+)(A)/(H^+A) \quad K_d = (H^+)(D)/(DH^+) \quad (22.54)$$

Равновесные превращения тройного комплекса можно представить в виде



Используя уравнение (22.54), запишем константу равновесия для этой реакции как

$$(H^+A)(D)/(A)(DH^+) = K_d/K_a \quad (22.55)$$

Таким образом, доля тройных комплексов α , в которых протон связан с А, может быть выражена через эти константы равновесия:

$$\alpha = (H^+A)(D)/[(H^+A)(D) + (A)(DH^+)] = (K_d/K_a)/(1 + K_d/K_a) \quad (22.56)$$

Используя определение $\Delta pK = pK_a - pK_d$, мы можем переписать этот результат в виде

$$\alpha = 10^{\Delta pK}/(1 + 10^{\Delta pK}) \quad (22.57)$$

Константа скорости второго порядка для реакции обмена равна $k_1\alpha$, т.е. она складывается из константы скорости образования тройного комплекса и доли комплексов, ведущих к обмену. Это ясно показывает, что скорость обмена зависит от разности в рК донора и акцептора.

На практике, поскольку радиоактивные доноры представлены лишь в следовых количествах, акцептор всегда находится в таком избытке, что его концентрация остается постоянной в ходе обмена. Поэтому процесс обмена подчиняется кинетике псевдопервого порядка с кажущейся константой скорости переноса протона $k_{\text{пер}}$, определяемой соотношением

$$k_{\text{пер}} = k_1(A)\alpha \quad (22.58)$$

Для данного протона pK_d постоянно, и α увеличивается с ростом рК, как следует из уравнения (22.57). Однако при фиксированном рН с ростом pK_a уменьшается (А), и, следовательно, наблюдаемая скорость обмена будет, как правило, максимальна при $pH > pK_a > pK_d$.

Уравнение (22.58) соответствует реакции, катализируемой щелочью. В чистой воде основанием является OH^- . Из выражения для α , определяемого уравнением (22.57), следует, что донор с $pK_d \approx 14$ при рН 7 будет обменивать протоны в течение миллисекунд, поскольку pK_a воды равно 14. Донор с $pK_d = 20$ будет обменивать протоны менее чем за час инкубации. Эквивалентное рассмотрение можно провести для класса реакций обмена, представленного реакцией 2; эти реакции катализируются кислотой.

Влияние любого катализатора С на скорость обмена протонов в молекуле М может быть описано в общем виде уравнением, аналогичным уравнению (22.58):

$$k_{\text{пер}} = k_1(C)\alpha \quad (22.59a)$$

$$\alpha = (K_M/K_C)/(1 + K_M/K_C) \quad (22.59b)$$

В этом выражении через K_M обозначена константа кислотной диссоциации той части молекулы, которая содержит обменивающийся протон, а через K_C — константа кислотной диссоциации катализатора. Иногда приходится рассматривать более сложные меха-

низмы, включающие катализ как кислотой, так и щелочью, а также молекулами воды и любыми другими растворенными молекулами, у которых значения pK_a близки к pK_a для данного протона. В большинстве случаев, однако, основным для данной реакции является какой-то один механизм обмена и процесс описывается уравнением (22.59) или аналогичным уравнением.

ТРИТИЕВЫЙ ОБМЕН В ОСНОВАНИЯХ ДВУХЦЕПОЧЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

На рис. 22.25 показана схема эксперимента для исследования тритиевого обмена в нуклеиновых кислотах. После инкубации в обогащенной тритием воде в течение длительного времени для установления равновесия раствор макромолекул быстро пропускают через короткую колонку с гелем. В результате такой процедуры весь тритиевый растворитель заменяется на нерадиоактивный растворитель. Начинается обратный обмен, и через заданное время образец пропускают через вторую колонку и определяют разницу в количестве оставшейся тритиевой метки. Для очень быстрых реакций обмена используют лишь одну колонку; при этом образец останавливают после прохождения половины колонки на какое-то время, в течение которого происходит обмен, а затем пропускают его до конца и анализируют.

Единственными протонами ДНК, для которых может установиться полное равновесие по отношению к тритиевому обмену в начальной стадии процесса, являются протоны NH_2 - и NH -групп четырех оснований. В РНК имеется еще один такой протон — он входит в состав 2'-гидроксила. Значения pK_a для этих протонов в нуклеозидах равно примерно 12; в случае РНК эти значения несколько ниже, и все же достаточно близки к pK_a воды,

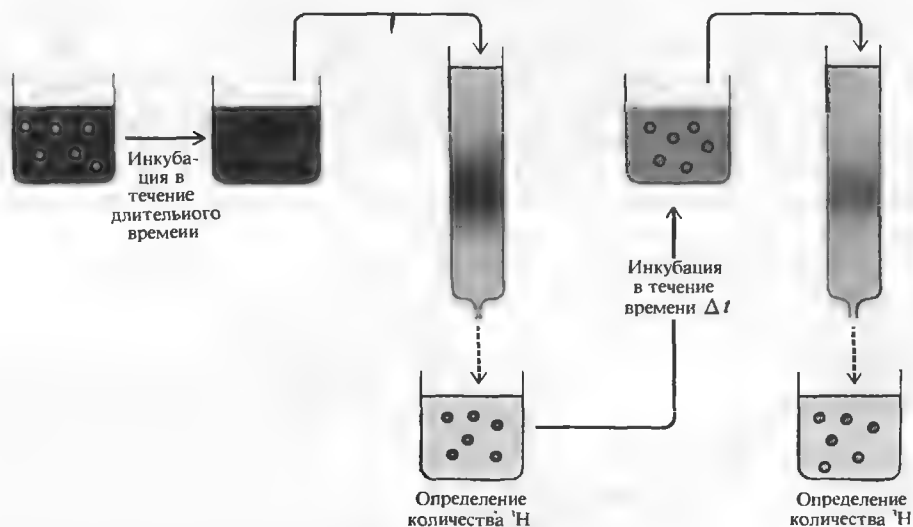


РИС. 22.25. Схема эксперимента по тритиевому обмену, основанному на использовании двух колонок. Плотность окраски указывает (приблизительно логарифмически) количество трития, присутствующего в образце на разных этапах. Колонки заполнены смолой (например, сефадексом), которая легко пропускает макромолекулы, но задерживает малые молекулы.

чтобы, согласно уравнению (22.58), происходил быстрый обмен. Значения pK_a NH-групп U, T и G, находящихся в виде мономеров, близки к 9; даже под сильным влиянием полиэлектролитной цепи они не могут стать больше 14 в полимерах. Поэтому процесс обмена должен происходить за миллисекунды или быстрее. Значения pK_a для депротонизации NH_2 -групп оснований неизвестны, но по аналогии с другими аминами они должны лежать в области от 20 до 30. Это означает, что катализируемый щелочью прямой перенос протона на эти группы должен быть очень медленным. Аналогичные соображения показывают, что катализируемый кислотой обмен протонов в экзоциклических аминогруппах также будет медленным.

Если в полинуклеотиде или другой молекуле имеется несколько разных классов способных к обмену протонов, кинетика обмена должна определяться суммой соответствующих вкладов от процессов первого порядка для каждого класса:

$$H(t) = \sum_i n_i e^{-k_i t} \quad (22.60)$$

где через $H(t)$ обозначено суммарное количество атомов трития, оставшихся в молекуле к моменту времени t , n_i — число атомов трития в i -м классе, k_i — константа скорости обмена для этого класса. Уравнение (22.60) следует непосредственно из того факта, что обмен каждого протона происходит независимо от обмена других.

В первых экспериментах по обмену, проведенных на ДНК из тимуса телят, самые малые зарегистрированные времена обратного обмена составляли около 120 с. К этому моменту в ДНК оставалось 1,9 атомов ^3H на пару оснований. Вплоть до времен порядка 1000 с кинетика обмена описывалась одной экспоненциальной кривой, причем в ДНК оставалось лишь 0,2 атома ^3H на пару оснований; при этом $\tau_{1/2} = 330$ с. Экстраполяция данных к нулевому моменту времени дала кажущееся начальное содержание $^3H = 2,3$ на пару оснований. Эта величина находится в очень хорошем согласии со значением, получающимся из расчетов в предположении, что все протоны, участвующие в образовании межцепочечных водородных связей, обмениваются медленно, а все остальные протоны обмениваются столь быстро, что этот обмен не удается наблюдать. В каждой АТ-паре имеется два протона, участвующих в образовании водородных связей, а в каждой ГС-паре — три. Исходя из известного нуклеотидного состава тимусной ДНК можно заключить, что на каждую пару оснований должно приходиться в среднем по 2,42 протона.

Усовершенствование экспериментальных методик позволило получить данные о более быстром обмене. Результаты одного из таких экспериментов на ДНК из тимуса телят приведены на рис. 22.26. Здесь кроме ранее наблюдавшегося обмена выявляется быстрый

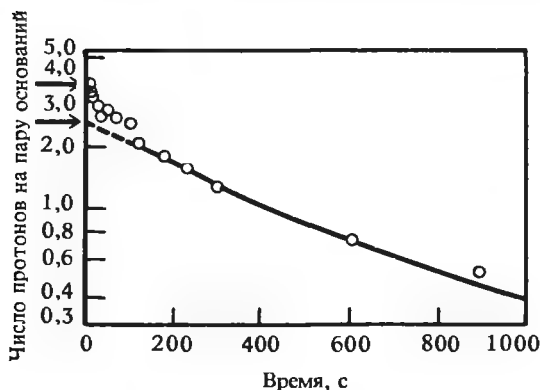


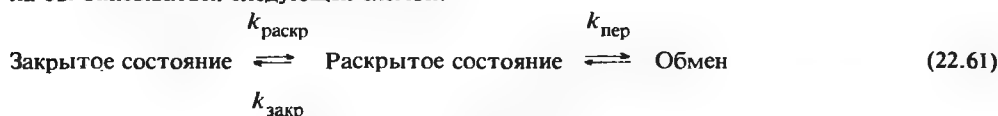
РИС. 22.26. Скорость обмена трития в нативной ДНК тимуса телят при $0^\circ C$, $0,1 M NaCl$, $pH 7,6$. Стрелками указано ожидаемое число способных к обмену протонов в расчете на пару оснований в этой ДНК (3,84) и число протонов, участвующих в образовании межцепочечных водородных связей (2,42). В ранних работах удавалось получить лишь данные, соответствующие большим временам (сплошная кривая). (Englander S. W., von Hippel P., J. Mol. Biol., 63, 171, 1972.)

процесс с $\tau_{1/2} = 25$ с. Если экстраполировать эти данные к нулевому моменту времени, то суммарное количество способных к обмену атомов трития окажется в прекрасном согласии со значением 3,84 атома ^3H на пару оснований, которое следует ожидать при полном обмене всех протонов в NH_2 - и NH -группах.

Вначале был сделан вывод, что быстрый обмен связан с протонами NH_2 -групп С, А и Г, не участвующими в образовании водородных связей. Однако это привело к противоречиям при количественном анализе наблюдаемых результатов. Поучительно проследить, как все-таки удалось объяснить эти данные. На самых первых этапах исследований считалось, что все протоны, не участвующие в образовании водородных связей, должны обмениваться быстро, независимо от значений их pK_a . В свете проведенного в предыдущем разделе рассмотрения это является сильным упрощением, но таким образом очень хорошо объяснились первые экспериментальные данные. Главным было то, что удавалось объяснить медленный обмен протонов, участвующих в образовании водородных связей.

ДИНАМИКА ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

Предположим, что для осуществления обмена необходимо флуктуационное раскрытие пары оснований. Это предположение совершенно обоснованно при условии, что необходимой предпосылкой для обмена является протонирование или депротонирование той группы, в которой должен произойти обмен. В этом случае кинетика обмена должна была бы описываться следующей схемой:



где $k_{\text{раскр}}$ и $k_{\text{закр}}$ — константы скоростей раскрытия и закрытия пары оснований, а через $k_{\text{пер}}$ обозначена константа скорости химического обмена протонов для пары, находящейся в раскрытом состоянии. Для простого химического механизма $k_{\text{пер}}$ определяется соотношением (22.58). Различие в структуре закрытой и открытой форм остается при этом не вполне ясным. По определению в закрытой форме не может происходить тритиевый обмен. Раскрытая форма, напротив, обладает тем свойством, что для нее скорость обмена такая же, как и в отсутствие парирования оснований. Для нуклеиновых кислот изменения в структуре двойной спирали, необходимые для осуществления обмена, представляют, вероятно, значительно меньшее возмущение, чем те, которые происходят при действительном выплавлении одиночной пары оснований.

Уравнения, соответствующие кинетической схеме (22.61), значительно упрощаются, если допустить, что вероятность существования раскрытых форм очень мала и использовать приближение стационарной концентрации раскрытых форм: $d(\text{Раскр.})/dt = 0$. В этом случае мы получаем: $(\text{Раскр.}) = (\text{Закр.})k_{\text{раскр}}/(k_{\text{закр}} + k_{\text{пер}})$. Поскольку нас интересуют лишь те формы, в которых еще остался тритий, можно в первом приближении считать, что $(\text{Закр.}) = N$, где через N обозначено количество трития, оставшегося в ДНК. Тогда скорость потери трития будет определяться уравнением

$$-dN/dt = k_{\text{пер}}(\text{Раскр.}) = k_{\text{раскр}}k_{\text{пер}}N/(k_{\text{закр}} + k_{\text{пер}}) \quad (22.62)$$

Рассмотрим два предельных случая обмена. Если $k_{\text{пер}} \gg k_{\text{закр}}$, раскрытие пары оснований сразу же ведет к обмену. Наблюдаемая скорость обмена равна просто скорости раскрытия: $k_{\text{обм}} = k_{\text{раскр}}$. Если $k_{\text{пер}} \ll k_{\text{закр}}$, раскрытая и закрытая формы будут находиться почти в полном равновесии между собой и $k_{\text{обм}} = K_{\text{равн}}k_{\text{пер}}$, где $K_{\text{равн}} = k_{\text{раскр}}/k_{\text{закр}}$.

Вопрос о том, лимитируется ли обмен скоростью раскрытия, можно выяснить экспериментально, поскольку в этом случае $k_{\text{обм}}$ не будет зависеть от концентрации катализатора. Х. Тейтлбаум и С. Ингландер (H. Teitlebaum, S. W. Englander, 1975) провели тщательное изучение тритиевого обмена на большом числе модельных полинуклеотидных си-

стем. Для $\text{poly}(\text{rA} \cdot \text{rU})$, $\text{poly}[\text{r(A} - \text{U)} \cdot \text{r(A} - \text{U)}]$ и $\text{poly}[\text{d(A} - \text{T)} \cdot \text{d(A} - \text{T)}]$ они обнаружили два класса процессов обмена в каждом случае: один более быстрый и два сравнительно медленных для каждой пары оснований. Более быстрый обмен не зависит от pH или присутствия катализатора, такого как имндазол или трис(гидроксиметиламино)метан; он должен, следовательно, лимитироваться раскрытием спирали. Таким образом, $k_{\text{раскр}}$ можно определить из скорости быстрого обмена: $k_{\text{раскр}} = k_{\text{обм}} = 0,06 \text{ с}^{-1}$. Более медленные процессы обмена также не зависят от pH, но они чувствительны к присутствию катализаторов. Более того, каталитическое ускорение процесса совершенно аналогично наблюдаемому для двойной спирали, образованной полиадениловой кислотой. Единственными протонами, участвующими в спаривании оснований в этой кислотной спирали, являются протоны NH_2 -группы аденина. Они должны медленно обмениваться и в парах уотсон-криковской двойной спирали, поскольку быстро обменивающимся является протон NH -группы в положении N-3 пиримидина. Этот результат противоположен ожидаемому из простых стерических соображений, согласно которым N-1-положение в пурине и N-3-положение в пиримидине являются наименее доступными в двойной спирали. Однако он находится в соответствии с тем фактом, что pK_a этих протонов значительно ближе к pK_a воды, чем pK_a протонов экзоциклических аминогрупп.

Теперь нужно объяснить, почему протоны аминогрупп, которые должны были бы экспонироваться с той же скоростью, что и протоны NH -групп, обмениваются медленнее, но не столь медленно, как следовало бы ожидать исходя из их значения pK_a . Весьма разумной является гипотеза о протонировании аденина не в положении N-6, а в положении N-1, вследствие чего создается необходимая промежуточная форма (рис. 22.27). Из опытов на модельных соединениях известно, что протонирование в положении N-1 понижает pK_a NH_2 -группы от 20—30 до приблизительно 8. В таком случае уравнение (22.59) нужно модифицировать, чтобы учесть существование предравновесия $\text{A} \rightleftharpoons \text{H}_{\text{N-1}}^+ - \text{A}$ с константой ионизации $K_{\text{N-1}}$ и то, что A может обмениваться лишь в раскрытом и протонированном

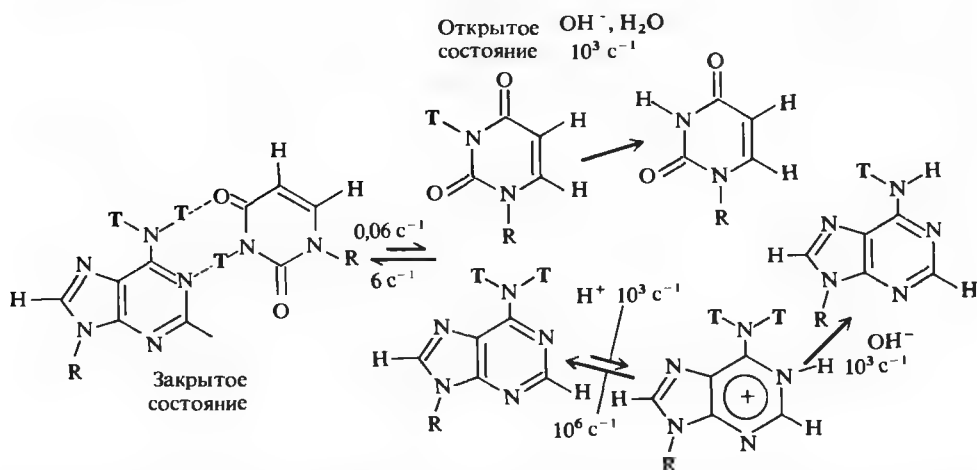


РИС. 22.27. Предполагаемые этапы обмена протонов AU-пар. Экспериментальные данные были проанализированы на основании модели, в которой предполагается, что для каждого акта обмена необходимо раскрытие пары оснований. Пары оснований оказываются открытыми 1% времени. В этом случае обмен протона NH -группы уридина может происходить по схеме общего основного катализа, тогда как в случае протонов NH_2 -групп необходим кислотно-основный катализ, при котором A сначала протонируется в положении N-1.

состоянии:

$$k_{\text{пер}} = \frac{(H^+)/K_{N-1}}{1 + (H^+)/K_{N-1}} (C)k_1\alpha = (H^+)K_{N-1}^{-1}k_1\alpha (C) \quad (22.63)$$

Упрощение правой части уравнения (22.63) было возможно потому, что значение K_{N-1} аденина в составе полимера равно примерно $10^{-4,3}$ и при нейтральных pH $(H^+)K_{N-1}^{-1} \ll 1$. Из уравнения (22.63) следует, что в том случае, когда катализатором является ион гидроксила, скорость изотопного обмена не должна зависеть от pH, поскольку при $(C) = (OH^-)$ произведение $(H^+)(OH^-) = K_w = 10^{-14}$. В присутствии других катализаторов скорость обмена будет меняться, что согласуется с экспериментальными данными для других протонов.

Поскольку k_1 и α известны из экспериментов на модельных системах, по данным о скорости обмена протонов аминогрупп с помощью уравнений (22.62) и (22.63) можно вычислить $K_{\text{равн}}$. Получаемое таким образом значение $K_{\text{равн}}$ равно 0,01 при 0°C. Этот результат является очень важным. Он означает, что один процент времени каждая пара оснований в двойной спирали находится в состоянии достаточно раскрытом, чтобы протон мог покинуть основание даже при такой низкой температуре. Тем самым опровергается мнение, что ДНК является жесткой статической структурой. Зная константу равновесия и константу скорости раскрытия, можно оценить скорость закрытия пар, которая оказывается равной примерно 6 с^{-1} , т.е. неожиданно низкой величиной. На рис. 22.27 суммированы данные о всех константах скорости и равновесия для обмена протонов в AU-паре.

Аналогичные исследования были выполнены для модельных GC-содержащих полимеров. В этих опытах следили за обменом пяти протонов NH- и NH₂-групп гуанина и NH₂-групп цитозина. Быстрее всего происходит обмен протонов NH-групп гуанина; скорость этого обмена лимитируется раскрытием пар. Обмену протонов NH₂-групп цитозина должно предшествовать раскрытие пар оснований, но скорость их обмена лимитируется протонированием, подобно обмену протонов NH₂-групп аденина. Протоны NH₂-групп гуанина обмениваются почти так же быстро, как и протоны цитидина. Однако значение pK_a для протонирования кольца гуанина на две единицы меньше, чем для цитидина, что должно приводить к меньшей в 100 раз скорости протонирования кольца, необходимого для обмена. Тот факт, что протоны NH₂-групп гуанина обмениваются значительно быстрее, чем следует ожидать исходя из этой схемы, заставляет предположить, что данный обмен в отличие от всех других может происходить без раскрытия пар оснований. Как показывает опыт, значения констант скоростей раскрытия и равновесия для GC-пар оказываются довольно близкими к таковым для AU- или AT-пар.

Результаты исследования реакций формальдегида, гидроксиламина и Hg(II) с ДНК в общих чертах согласуются с тем выводом, что пары оснований в ДНК находятся в раскрытом состоянии около одного процента времени. По термодинамическим данным доля раскрытых звеньев должна быть значительно меньше. Следует иметь в виду, однако, что константа равновесия процесса раскрытия, полученная при изучении протонирования или реакционной способности оснований в спирали, может отличаться от константы, определенной из данных по плавлению ДНК. Не исключено, что плавление двойной спирали сопровождается большим изменением структуры¹.

¹ Детальный анализ данных по модификации ДНК формальдегидом показывает, что эти результаты полностью согласуются с предсказаниями термодинамической теории, и приводит к величине вероятности раскрытия пар порядка 10^{-5} (см. Frank-Kamenetskii M. D. *Comm. Mol. Cell. Biophys.*, **81**, 105, 1981; Франк-Каменецкий М. Д. *Молек. биол.*, **17**, 639, 1983). Причины столь существенного расхождения результатов, основанных на изучении флукуационных раскрытий пар формальдегидным методом и методом водородного обмена, пока не выяснены. Возможно, водородный обмен требует менее значительных изменений структуры, т.е. «неполных» раскрытий. Не исключено также, что водородный обмен экзоциклических аминогрупп оснований может идти в двойной спирали вообще без какого-либо раскрытия пар оснований. — *Прим. ред.*

ПРЯМОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА ОТДЕЛЬНЫХ ПРОТОНОВ

Пример, который мы только что подробно рассмотрели, показывает, что эксперименты по тритиевому обмену в принципе являются достаточно информативными. Однако при исследовании более сложных систем разграничить разные кинетические процессы становится труднее. Еще большие трудности возникают при идентификации этих процессов. Ранние исследования на тРНК показали, что в этой молекуле происходит значительно более медленный обмен протонов, чем тот, который можно объяснить наличием водородных связей. В то время казалось, что существование столь низких скоростей связано с особенностями третичной структуры этой молекулы. Теперь, после всестороннего изучения процессов обмена в ДНК, детальный анализ данных для тРНК представляется слишком сложной задачей. Таким образом, основная проблема состоит в том, что при наблюдении лишь за общей скоростью обмена теряется большая часть информации. Нужны методы, которые позволили бы независимо следить за обменом отдельных протонов или по крайней мере определенных групп протонов. Такую возможность дает использование метода ЯМР, который обладает достаточно высоким разрешением, чтобы можно было выполнить это требование. Следует иметь в виду, однако, что расшифровка спектров ЯМР представляет серьезную проблему. Примеры применения этого метода были приведены выше, когда мы рассматривали спектры ЯМР не способных к обмену протонов одиночных цепей. Другой подход состоит в прямом проведении химического обмена, отборе молекул, в которых произошло частичное замещение, и анализе локализации отдельных обменивающихся остатков путем фрагментации молекулы нуклеиновой кислоты и выявления локализации атомов трития в каждой точке последовательности. Такая процедура является довольно громоздкой, но затрачиваемые усилия вознаграждаются тем, что удается получить много ценной информации.

Проблема здесь состоит в том, чтобы найти процесс обмена, достаточно быстрый при одних условиях, чтобы можно было регистрировать количества обменивающихся протонов, но все же достаточно медленный при других условиях, чтобы можно было провести ферментативное расщепление и электрофоретический или хроматографический анализ, не опасаясь, что доля обменивавшихся протонов изменится. По-видимому, прекрасно удовлетворяет этим требованиям тритиевый обмен протона C^8-N в пуринах. Основные результаты анализа этого обмена приведены в табл. 22.5. Энергия активации реакции обмена протона C^8-N оказывается очень высокой. Так, при изменении температуры от 100 до 90°C время полуреакции для мононуклеотидов увеличивается приблизительно от 1 до 3 часов. Напомним, что дейтериевый обмен при этих условиях был использован для идентификации линий в спектрах ЯМР димеров. При 30°C время полуреакции обмена составляет около 1000 ч. За это время можно провести практически любой химический анализ без заметного изменения доли обменивавшихся протонов, если только не работать при

Таблица 22.5

СКОРОСТЬ ВОДОРОДНО-ТРИТИЕВОГО ОБМЕНА
ДЛЯ ПРОТОНОВ, СВЯЗАННЫХ С АТОМАМИ УГЛЕРОДА
ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ^{1), 2)}

Температура, °C	G	A	poly(A)	poly(A·U) (A)	Вирусная РНК (A+G)	ДНК (A+G)
100	$7,7 \cdot 10^{-1}$	$3,7 \cdot 10^{-1}$	—	—	—	$5,5 \cdot 10^{-1}$
95	—	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	—	—
60	$2,1 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$6,2 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	—	$9,1 \cdot 10^{-3}$
37	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$6,1 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$

¹⁾ По данным работы Р. Schimmel et al.

²⁾ Скорость обмена выражена в следующих единицах: $\text{имп} \cdot \text{нмоль}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{Ки}^{-1}$.

крайних значениях рН. Должна ли зависеть скорость обмена протонов C^8-H в пуринах от того, в каком состоянии находится основание — спаренном или нет, — а priori неясно. Дело в том, что эти протоны расположены в большом желобке спирали В-формы ДНК. Известно, однако, что обмен протонов C^8-H происходит в три раза медленнее в одноцепочечных полимерах при наличии стэкинга оснований и в 40 раз медленнее в двухцепочечной РНК, чем в мономерах при 37°C. Сходный, хотя и несколько меньший эффект наблюдается для ДНК. Таким образом, обмен C^8-H можно с успехом использовать для анализа вторичной структуры нуклеиновых кислот с известной последовательностью. Примеры такого рода приведены в гл. 24.

ИЗМЕНЕНИЕ ТИПА ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Все рассмотренные до сих пор методы позволяют определять долю звеньев, находящихся в спиральном состоянии, и стабильность вторичной структуры ДНК, но не дают никакой информации о том, какая вторичная структура действительно существует в растворе. Один из наиболее перспективных подходов к идентификации вторичной структуры был развит М. Маэстри (М. Maestre), который показал, что можно надежно измерять спектры КД пленок ДНК, поддерживаемых при постоянной относительной влажности. Этим методом были получены спектральные данные для условий, очень близких к тем, которые использовались при рентгеноструктурном анализе волокон ДНК. Аналогичный подход был применен при регистрации спектров комбинационного рассеяния (W. Peticolas).

Структура двойной спирали ДНК в волокнах изменяется в зависимости от концентрации соли и относительной влажности от В-формы до А- или С-формы. Маэстри обнаружил, что спектры КД пленок ДНК при подобных внешних воздействиях тоже радикальным образом изменяются (рис. 22.28, А): понижение относительной влажности пленок натриевой соли ДНК из тимуса телянка от 92 до 75 % приводило к тому, что вместо консер-

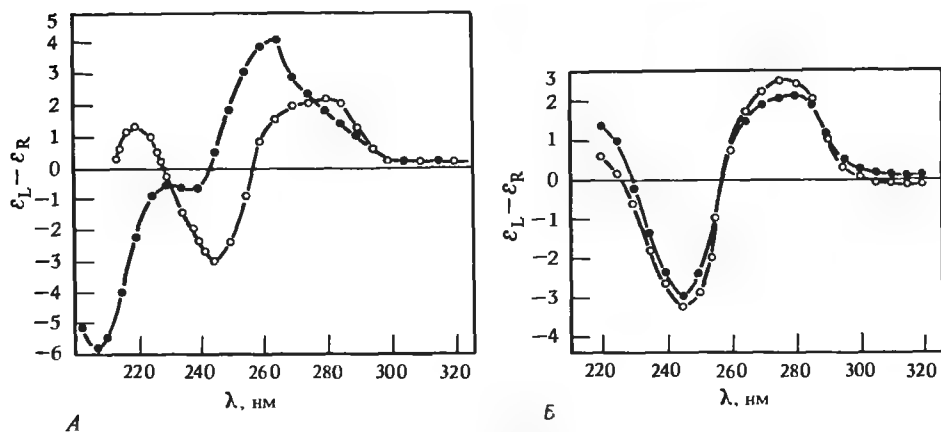


РИС. 22.28. Спектры кругового дихроизма ДНК из тимуса телянка в пленках при определенной влажности. А. Натриевая соль ДНК при относительной влажности 92% (○), когда по данным рентгеноструктурного анализа двойная спираль находится в В-форме, и при относительной влажности 75% (●), когда спираль находится в А-форме. Б. Сравнение спектра В-формы, представленного на рис. А, со спектром водного раствора той же ДНК. Эти результаты служат веским аргументом в пользу того, что в разбавленных водных растворах ДНК находится в В-форме. (Tunis-Schneider M., Maestre M., J. Mol. Biol., 52,521, 1971.)

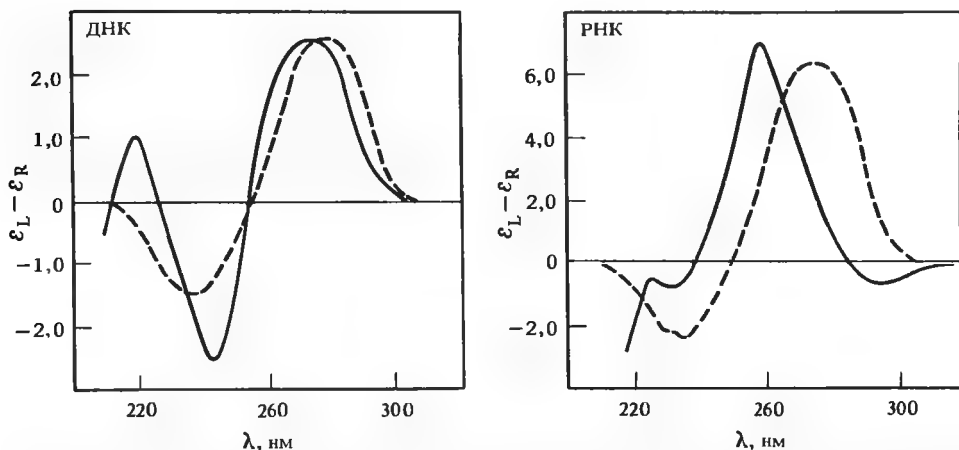


РИС. 22.29. Спектры кругового дихроизма ДНК в В-форме и двухцепочечной РНК. Экспериментальные кривые (сплошные линии) были получены при комнатной температуре для разбавленных нейтральных растворов. Теоретические кривые (пунктирные линии) получены на основании квантовомеханического рассмотрения взаимодействия между основаниями. (Johnson W. C., Tinoco I., Jr., Biopolymers, 7, 727, 1969.)

вативного спектра КД экситонного типа наблюдался спектр, состоящий из одного пика в ближней УФ-области. Такое изменение влажности в волокнах вызывает, как известно, переход ДНК из В- в А-форму. Таким образом, удастся идентифицировать спектр КД двух спиральных форм ДНК. На рис. 22.28,Б приведены для сравнения спектр КД пленки ДНК в В-форме и спектр разбавленного водного раствора ДНК тимуса телят. Спектры оказываются идентичными, и это является веским аргументом в пользу того, что в разбавленных солевых растворах ДНК находится в В-форме.

Спектральные изменения, сопровождающие переход из А- в В-форму, согласуются с изменениями в структуре. У.-К. Джонсон и И. Тиноко (W.-C. Johnson, I. Tinoco) вычислили спектр КД спиралей ДНК и РНК, используя описанный в гл. 8 (в упрощенной форме) теоретический подход. РНК-11 очень близка по своей структуре к А-форме ДНК, следовательно, ее спектр КД должен быть аналогичен спектру ДНК в А-форме. На рис. 22.29 сопоставлены результаты этих расчетов с экспериментальными данными. Хотя согласие и не является полным (что неудивительно, учитывая неточность данных, касающихся электронных свойств оснований нуклеиновых кислот), расчеты правильно предсказывают, что спектр РНК-11 и ДНК-А должен быть значительно менее консервативным. Обратите также внимание на сходство спектров КД двухцепочечной РНК и А-формы ДНК (рис. 22.28).

Изменение условий в растворе также должно вызывать переход из одной спиральной формы в другую. Действительно, увеличение концентрации этанола до 80 % приводит к спектральным изменениям, сходным с изменениями спектра КД при переходе В → А в пленках. Это довольно естественно, поскольку добавление такого большого количества этанола эквивалентно понижению влажности. Следует отметить, что эксперименты, связанные с изменением условий в растворе, довольно сложны, поскольку при изменении конформации спирали может произойти денатурация и агрегация ДНК. Еще более сложные эффекты наблюдаются в случае таких растворителей и условий, при которых изменяется не только вторичная, но и третичная структура ДНК.

ПРЕДПЛАВЛЕНИЕ ДНК

Структура нативной ДНК претерпевает некоторые изменения при варьировании внешних условий даже в разбавленных солевых растворах, и характер этих изменений только сейчас начинает проявляться. Спектр КД нативной ДНК сильно зависит от температуры в интервале от 0°C до T_m . На рис. 22.30 приведен пример такого изменения в спектре $\text{poly}[\text{d}(\text{A}-\text{T}) \cdot \text{d}(\text{A}-\text{T})]$. Аналогичные результаты были получены для всех исследованных ДНК. Структурные изменения, отвечающие этому предплавлению, представляют собой постепенный переход от В-формы ДНК при высокой температуре к С-форме при низкой. Другие объяснения этого эффекта легко опровергнуть. Предплавление, регистрируемое с помощью КД, не связано с локальной денатурацией наиболее легкоплавких участков, поскольку в этом случае наблюдаемые изменения должны были бы увеличиваться при понижении концентрации соли. Однако этот параметр мало влияет на перестройку структуры, происходящие ниже T_m (рис. 22.30). Предплавление не может быть связано и с переходом $\text{A} \leftrightarrow \text{V}$, поскольку он также чувствителен к концентрации соли. Дело в том, что спираль в А-форме значительно плотнее, чем в В, и расстояние между фосфатными группами в ней гораздо меньше. При концентрации соли 10^{-2} М значение $G_{\text{эл}}$ для В-формы, вычисленное по уравнению (22.4), оказывается на $0,1 \text{ ккал} \cdot (\text{моль фосфатов})^{-1}$ меньше, а при концентрации соли 1 М различие в $G_{\text{эл}}$ между А- и В-формами оказывается незначительным. Анализ спектров КД $\text{poly}[\text{d}(\text{A}-\text{T}) \cdot \text{d}(\text{A}-\text{T})]$ путем сопоставления данных для раствора со спектрами пленок довольно ясно показывает, что наблюдаемое предплавление ДНК является переходом от спирали В-типа к спирали С-типа.

Выявляемое по спектрам КД и с помощью некоторых других методов предплавление свидетельствует о том, что геометрия двойной спирали в растворе не является фиксированной: она изменяется с изменениями концентрации соли и температуры. Эти изменения становятся особенно существенными в кольцевых ДНК (гл. 24). Совершенно очевидно, что для объяснения всех наблюдаемых особенностей двойной спирали ДНК необходимо значительно более полно изучить эту структуру.

КОМПАКТНЫЕ ФОРМЫ ДНК

В водных солевых растворах молекулу ДНК можно представить в виде червеобразного, довольно жесткого клубка, в котором удаленные друг от друга участки цепи почти не вза-

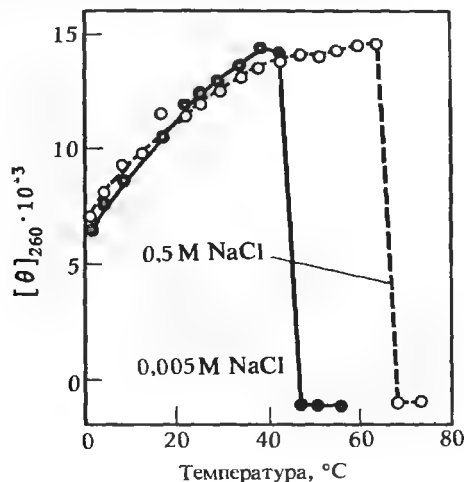


РИС. 22.30. Зависимость кругового дихроизма $\text{poly}[\text{d}(\text{A}-\text{T}) \cdot \text{d}(\text{A}-\text{T})]$ от температуры при pH 7,0 для двух концентраций соли. В отличие от спектров поглощения спектры КД существенно изменяются при температурах ниже интервала плавления. (Gennis R. B., Cantor C. R., J. Mol. Biol., **69**, 381, 1972.)

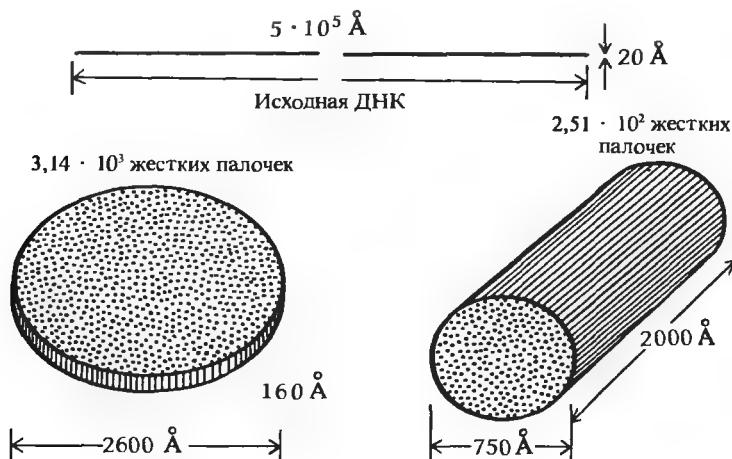


РИС. 22.31. Две гипотетические структуры ψ -частиц ДНК фага Т4. Было сделано удивительное наблюдение, состоящее в том, что нейтральные полимеры типа полиэтиленгликоля вызывают конденсацию ДНК. Обе модели качественно согласуются с данными о степени компактизации ДНК, хотя действительные параметры плотно свернутой ψ -формы ДНК неизвестны.

имодельствуют (см. гл. 19). Иначе говоря, у молекулы ДНК нет четко выраженной третичной структуры. Однако добавление некоторых полимеров, например полиэтиленгликоля, вызывает значительное изменение всех физических свойств раствора ДНК. Этот эффект полностью обратим и наблюдается в узкой области концентраций соли и полимера. Переход приводит к образованию формы ДНК, названной Л. Лерманом (L. S. Lerman), открывшим ее, ψ -формой, и сопровождается сорокакратным увеличением интенсивности спектра КД. Кроме того, резко возрастает коэффициент седиментации: для ДНК фага Т4 $s_{20,w}^{50}$ увеличивается от 62S в обычных растворах до 300—600S.

Объяснить такие огромные изменения можно единственным способом: предположив, что ДНК конденсируется в плотно упакованную структуру. Эта конденсация происходит под действием тех же факторов, которые обуславливают эффект исключенного объема. Клубкообразные полимеры занимают столь большой объем, что захватывают значительное количество растворителя. Если между двумя полимерами разной природы существуют силы отталкивания, даже не слишком большие, то в общем случае гомогенный раствор смеси двух полимеров не будет образовываться. Раствор разделится на две фазы, в каждой из которых будет присутствовать преимущественно полимер одного типа. Предполагается, что ψ -форма ДНК является одной такой фазой, только вместо образования макроскопической границы между фазами происходит просто компактизация каждой отдельной молекулы ДНК.

Структура ψ -ДНК до конца не установлена, но большинство данных свидетельствует о том, что она состоит из плотно уложенных в пучок палочек. Такая структура очень похожа на кристалл, образуемый многими другими линейными полимерами, и на структуру, наблюдавшуюся в кристаллах низкомолекулярной ДНК. На рис. 22.31 показаны две гипотетические структуры таких ψ -частиц. Одна из них основана на результатах измерения длины пучков в кристаллах, другая — на электронно-микроскопических исследованиях палочкообразных структур, образуемых ДНК фага Т4 в этаноле. Естественно, это лишь два крайних случая среди многих возможных. Коэффициент седиментации для этих структур должен быть равен 469 и 713S соответственно, что близко к наблюдаемым значениям.

На первый взгляд кажется, что условия, которые создаются в растворе в присутствии полиэтиленгликоля, очень далеки от тех, которые могут иметь место в биологических системах. Однако есть соображения в пользу того, что ψ -форма ДНК или ее аналоги играют важную роль в природе. Внутри головки бактериофагов ДНК должна быть уложена очень плотно. Так, коэффициент седиментации целого фага Т4 составляет 890S. Это как раз та область значений, которая характерна для ψ -формы ДНК. В конденсированном хроматине, таком, какой обнаруживается в хромосомах на стадии метафазы, ДНК также должна быть уложена в плотные структуры; ψ -форма может служить моделью этих образований. Природа выбрала специальные молекулы для организации и упорядочивания таких свернутых цепей ДНК: это гистоны и протамины. С их участием образуются значительно более совершенные регулярные структуры, чем те, которые соответствуют ψ -форме ДНК.

Краткие выводы

Одноцепочечные нуклеиновые кислоты представляют собой сравнительно регулярные спиральные структуры, в которых определенная доля оснований участвует в стэкинг-взаимодействии и которые постепенно плавятся при повышении температуры. Свойства динуклеотидов весьма близки к свойствам соответствующих полимеров. При изменении ионной силы спектральные свойства одиночных полинуклеотидных цепей почти не меняются. Эти наблюдения показывают, что, хотя одиночные цепи характеризуются значительной локальной упорядоченностью, они не образуют протяженных регулярных структур. Различия в конформационных свойствах между одноцепочечными РНК и ДНК сохраняются вплоть до динуклеотидов.

Двухцепочечные нуклеиновые кислоты плавятся при повышении температуры в сравнительно узком интервале. Пропорциональность температуры плавления логарифму ионной силы раствора указывает на то, что двойная спираль дестабилизируется электрическим отталкиванием цепей. Двойная спираль связывает больше противоионов, чем две соответствующие одиночные цепи. Стабильность двойной спирали увеличивается с ростом мольной доли GC-пар и уменьшается при смещении pH от нейтральных значений в ту или другую сторону. Плавление природной ДНК является более сложным процессом, чем плавление синтетических полинуклеотидов, поскольку стабильность отдельных участков двойной спирали различается. Хотя главным фактором, определяющим локальную стабильность, является нуклеотидный состав, в некоторых случаях существенную роль может играть последовательность оснований.

Некоторые гомополимеры могут образовывать как двух-, так и трехцепочечные спирали. Исследование их оптических или термодинамических свойств в зависимости от внешних условий позволяет построить фазовую диаграмму, которая в удобной форме описывает все свойства системы. Она оказывается особенно полезной для выбора условий, в которых может существовать лишь одна конформация.

Четко показано, что нуклеиновые кислоты обладают конформационной подвижностью. Согласно данным тритиевого обмена, пары оснований могут сравнительно часто открываться и закрываться. Оптические исследования показывают, что при понижении температуры ниже T_m происходит постепенный переход от двойной спирали В-типа к спирали С-типа. Добавление органических растворителей может стимулировать переход В $\rightarrow$ А, а в некоторых случаях приводит к быстрой конденсации ДНК с образованием компактной свернутой структуры.

Задачи

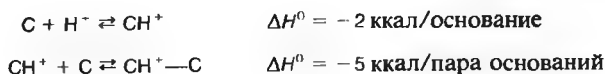
22.1. Олигонуклеотиды образуют двух- или трехцепочечные комплексы с полинуклеотидами. Например, АрАрАрАрАрА образует двойную спираль с poly(U), а UpUpUpUpUpU — с poly(A). Схематически эти комплексы можно изобразить так: =====.

а. С помощью каких экспериментов можно было бы определить, покрывают ли олигомеры все возможные места связывания на полимере?

б. Похожа ли спираль, образуемая комплексом олигомер — полимер, на ту, которая получается для комплекса полимер — полимер?

в. Объясните, почему комплекс $\text{oligo(A)} \cdot \text{poly(U)}$ значительно более стабилен, чем комплекс $\text{oligo(U)} \cdot \text{poly(A)}$.

22.2. Постройте схематическую фазовую диаграмму для poly(C) как функцию температуры (вертикальная ось) и pH (горизонтальная ось). Используйте следующие (гипотетические) термодинамические данные для ионизации и образования пар оснований:

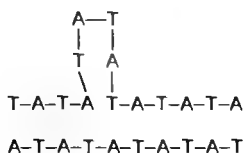


Существует ли такое значение pH, при котором можно было бы наблюдать два температурных перехода в poly(C)? *Указание.* Прежде всего запишите уравнения реакций для всех путей образования кислой формы двойной спирали и для диссоциации этой спирали на две протонированные одиночные цепи.

22.3. При низкой температуре и высокой концентрации Mg^{2+} для poly(U) наблюдается резкое увеличение гипохромизма и оптической активности. Предполагается, что при этом образуется спиральная структура. Какого типа эксперименты необходимо поставить, чтобы выяснить, является ли эта спираль двухцепочечной или многоцепочечной и параллельны или антипараллельны цепи?

22.4. Рассмотрим длинную цепь ДНК, содержащую только АТ-пары. Сколько независимых переменных необходимо для описания вклада, который дает взаимодействие между ближайшими соседями в оптические свойства этой молекулы (поглощение или КД)? Какой набор простых повторяющихся последовательностей ДНК следует проанализировать для получения этих независимых переменных, необходимых для описания спектра ДНК, которая состоит только из АТ-пар?

22.5. Как будет влиять на скорость тритиевого обмена наличие выступающих петель в структуре $\text{poly}[\text{d(A-T)} \cdot \text{d(A-T)}]$?



ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr.*, 1974. Physical Chemistry of Nucleic Acids, New York, Harper and Row.
- Felsenfeld G., Miles H. T.*, 1967. The physical and chemical properties of nucleic acids, *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 407.
- Record M. T., Jr., Anderson C. F., Lohman T. M.*, 1978. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: The roles of ion association or release, screening and ion effects on water activity, *Quart. Rev. Biophys.*, **11**, 103.
- Ts'o P. O. P.*, 1974. Dinucleoside monophosphates, dinucleotides and oligonucleotides. In: Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, vol. 2, ed. P. O.P. Ts'o, New York, Academic Press, p. 305.

Специальная

- Brahms S., Brahms J., van Holde K. E.*, 1976. Nature of conformational changes on poly [d(A—T) d(A—T)] in the premelting region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3453.
- Lerman L. S.*, 1974. The polymer and salt-induced condensations of DNA. In: Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids, vol. 3, ed. J. Duchesne, London, Academy Press.
- Manning G. R.*, 1978. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrolyte properties of polynucleotides, *Quart. Rev. Biophys.*, **11**, 179.
- Palecek E.*, 1976. Premelting changes in DNA conformation. In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 18, ed. W. E. Cohn, New York, Academic Press, p. 151.
- Sundaralingam M., Rao S. T.*, 1975. Structure and Conformations of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions, Baltimore, Md., University Park Press.
- Teitlebaum H., Englander S. W.*, 1975. Open states in native polynucleotides, 1: Hydrogen-exchange study of cytosine-containing double helices, *J. Mol. Biol.*, **92**, 55; 79.
- Wellauer P. K., Dawid I. B.*, 1974. Structure and processing of ribosomal RNA: A comparative electron microscopic study in three animals, *Brookhaven Symp. Biol.*, **26**, 214.
- Wells R. D., Larson J. E., Grant R. C., Shortle B. E., Cantor C. R.*, 1970. Physicochemical studies on polydeoxyribonucleotides containing defined repeating nucleotide sequences, *J. Mol. Biol.*, **54**, 465.
- Wensink P. C., Brown D. D.*, 1971. Denaturation map of the ribosomal DNA of *Xenopus laevis*, *J. Mol. Biol.*, **60**, 235.

Глава 23 **Статистическая механика и кинетика взаимодействий в нуклеиновых кислотах**

23.1. Статистическая термодинамика образования двойной спирали

В этой главе мы рассмотрим более детально равновесие между одно- и двухцепочечным состояниями нуклеиновых кислот. Мы покажем, каким образом информация, полученная при изучении стабильности олигонуклеотидных комплексов, может быть прямо использована для предсказания вторичной структуры нуклеиновых кислот, а исследование кинетических свойств олигонуклеотидов — для анализа кинетики переходов между одно- и двухцепочечными формами. Наконец, мы остановимся на образовании комплексов между олигонуклеотидами и лигандами и используем эту систему для анализа взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами.

Рассмотрим вначале вопросы статистической термодинамики образования двойной спирали. Природные ДНК и РНК и даже гомогенные по последовательности синтетические полинуклеотиды столь сложны, что попытки разграничить типы термодинамических взаимодействий, ответственных за образование упорядоченных структур, оказываются безуспешными. Прекрасной моделью для исследования таких взаимодействий являются олигонуклеотиды, поскольку их длина может изменяться в любых пределах. Рис. 23.1. иллюстрирует конкретные вопросы, которые можно исследовать, используя олигонуклеотиды. Как велико влияние последовательности на стабильность двойной спирали? Как сказывается на стабильности наличие одноцепочечных концов, одноцепочечных петель, разрывов в одной или обеих цепях? Как влияет на стабильность структур со шпильками размер петли в шпильке? В принципе следовало бы проверить влияние последовательности оснований (или по крайней мере нуклеотидного состава) на все эти эффекты. Хотелось бы также найти значения свободной энергии для каждого из десяти специфических взаимодействий между соседними парами в двойной спирали и выяснить влияние на эти параметры различных конфигураций неспаренных оснований.

ИССЛЕДОВАНИЯ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ МЕТОДОМ ЯМР

Наиболее удобными для исследований являются самые короткие олигонуклеотиды, которые только могут образовывать данную структуру. С другой стороны, определяемая экспериментально свободная энергия зависит от множества различных взаимодействий, и, для того чтобы определить вклад в эту величину отдельных элементов структуры, необходимо исследовать целую серию сходных комплексов. Мононуклеозиды образуют комплексы со спариванием оснований в органических растворителях. О спаривании мононуклеозидов в водных растворах существуют лишь косвенные данные. Пары оснований в воде начинают образовываться при столь высоких концентрациях, что в этих условиях формируются стопкообразные агрегаты мономеров, и это затрудняет детальный количественный анализ. Динуклеозидфосфаты могут образовывать комплексы со спариванием оснований при концентрациях 0,04 — 0,08 М. Такие концентрации слишком высоки для того, чтобы можно было использовать большинство оптических методов, но именно они весьма удобны для исследований с помощью ЯМР. Спектр ЯМР от протонов самоком-

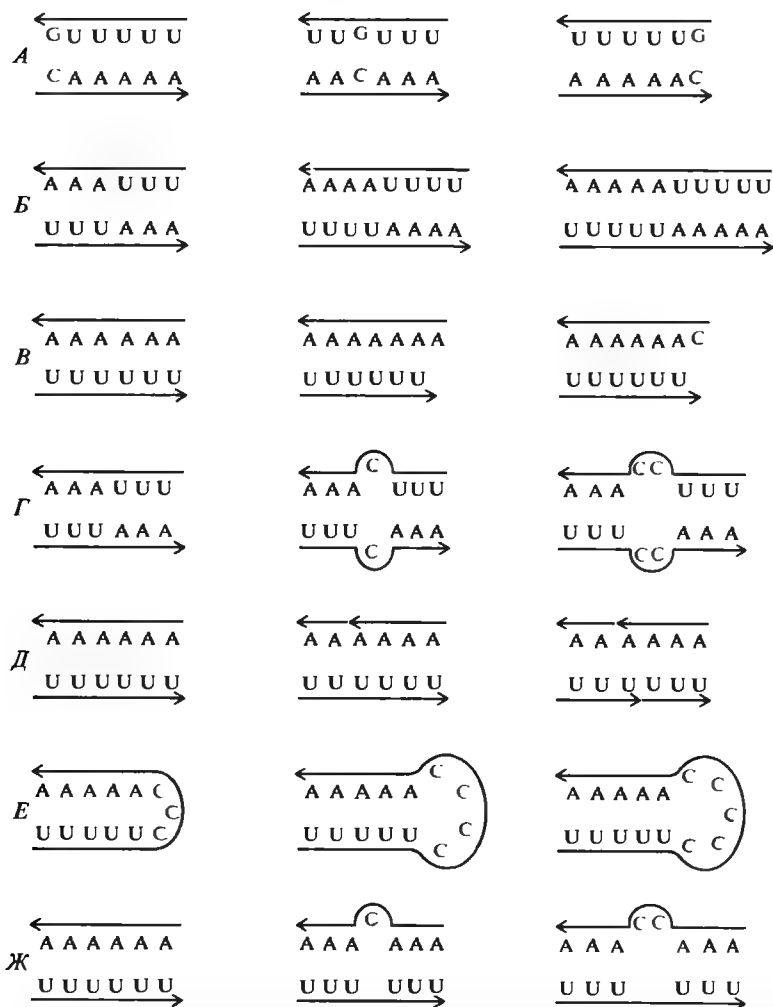


РИС. 23.1. Сравнивая свойства разных олигонуклеотидов, можно получить ценную информацию о взаимодействиях, стабилизирующих двойную спираль. Сопоставление значений T_m позволяет выявить влияние на стабильность (А) последовательности оснований, (Б) длины двойной спирали, (В) стэкинга в одиночных цепях, (Г) наличия некомплементарных пар, (Д) фрагментации цепи, (Е) длины петель в шпильках и (Ж) выталкивания оснований, нарушающих комплементарность, из спирали.

плементарных динуклеозидфосфатов или динуклеозидов может быть получен непосредственно для водных растворов с использованием метода фурье-преобразования, который уменьшает нежелательный вклад спектра ЯМР растворителя. Результаты измерений сильно зависят от концентрации.

На рис. 23.2 суммированы результаты исследований pdGpdC и pdCpdG методом ЯМР. По мере увеличения концентрации олигонуклеотидов сигналы от всех наблюдаемых протонов немного смещаются в сторону более сильных полей, и лишь для двух линий, отвечающих NH_2 -группе цитидина и NH_2 -группе гуанозина, наблюдается слабopольный сдвиг, причем на значительно большую величину. Сдвиг в сторону больших полей связан

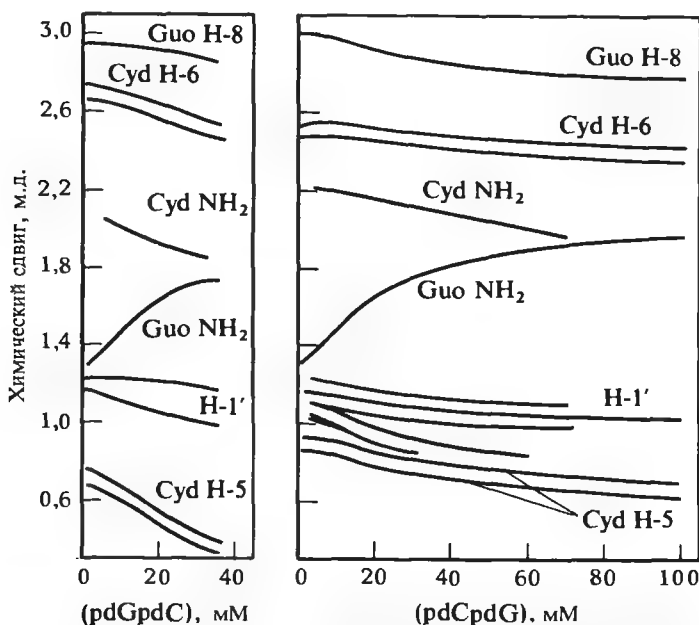


РИС. 23.2. Самоассоциация pdGpdC и pdCpdG , наблюдаемая с помощью ЯМР. Приведены зависимости химического сдвига каждого протона от молярной концентрации динуклеотида. Обратите внимание, что двум протонам Cyd NH_2 отвечают два разных пика, в то время как для протонов Guo NH_2 наблюдается лишь один пик. Сдвиг линий в сторону меньших значений м.д. при увеличении концентрации указывает на возникновение стэкинга; образование водородных связей приводит к сдвигам пиков в область больших значений м.д. (Young M. A., Krugh T. R., *Biochemistry*, **14**, 4841, 1975.)

с влиянием кольцевых токов, обусловленным стэкингом; сдвиг в области слабых полей, по-видимому, указывает на образование водородных связей. Концентрация, при которой линии перестают смещаться, для pdCpdG оказывается выше, чем для pdGpdC ; таким образом, в случае pdCpdG спаривание оснований происходит менее эффективно, чем в случае pdGpdC .

Некоторые интересные особенности спектра на рис. 23.2 заслуживают особого внимания. Линия, отвечающая протону NH -группы гуанозина, в спектре не наблюдается, что связано, по-видимому, с ее уширением за счет обмена с растворителем, который идет даже в тех условиях, когда в растворе существует лишь двойная спираль. Аналогичный эффект наблюдается и в олигонуклеотидах большей длины. Это понятно, поскольку скорость обмена для NH -группы значительно выше, чем для NH_2 -группы (гл. 22). Двум протонам NH_2 -группы цитидина в димере отвечают два разных пика. Один из них при увеличении концентрации смещается в область слабых полей и соответствует протону, участвующему в образовании водородной связи; второй смещается в область сильных полей. По-видимому, вращение вокруг связи $\text{Cyd C} - \text{NH}_2$ происходит достаточно медленно из-за наличия в этой группе примеси состояния с двойной связью. Поэтому два протона NH_2 -группы остаются неэквивалентными и в свободном димере, и в комплексе со спариванием оснований. Напротив, для двух протонов NH_2 -групп гуанозина наблюдается лишь одна линия. Это означает, что даже при образовании димерами комплексов со спариванием оснований вращение вокруг связи $\text{Guo C} - \text{NH}_2$ происходит достаточно быстро и в результате два данных протона оказываются эквивалентными. Напомним, что обмен этих про-

тонов в двойной спирали ДНК может происходить без раскрытия пар оснований; возможно, что относительная свобода обмена связана с быстрыми вращательными переходами.

Данные, аналогичные приведенным на рис. 23.2, могут быть использованы для анализа термодинамики взаимодействий в олигонуклеотидах. В пределе быстрого обмена между состояниями в реакции $2M \rightleftharpoons M_2$ каждому протону в спектре ЯМР будет соответствовать одна линия с химическим сдвигом $\delta_{\text{набл}}$, равным

$$\delta_{\text{набл}} = \chi'_M \delta_M + \chi'_{M_2} \delta_{M_2} = \delta_M + (\delta_{M_2} - \delta_M) \chi'_{M_2} \quad (23.1)$$

где δ_M — химический сдвиг для свободных димеров, δ_{M_2} — химический сдвиг для комплекса. Это соотношение по форме совершенно аналогично соотношению (22.26), за исключением того, что χ'_{M_2} является мольной долей определенных протонов в комплексе. Поскольку в этом комплексе каждый такой протон представлен дважды, $\chi'_{M_2} = 2(M_2)/[2(M)_2 + (M)]$. Если через K обозначить константу равновесия для образования комплекса, через M_0 — полную концентрацию динуклеотидов, то простые выкладки приведут к соотношению

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_M + (\delta_{M_2} - \delta_M) [(1 + 4KM_0 - \sqrt{1 + 8KM_0})/4KM_0] \quad (23.2)$$

Анализируя экспериментальные данные на основании этого уравнения, можно определить параметры спектров ЯМР δ_M и δ_{M_2} и константу равновесия K . Аналогичным образом можно исследовать с помощью ЯМР равновесные переходы между двумя разными димерами (например, $\text{GrG} + \text{CpC} \rightleftharpoons \text{Комплекс}$). В табл. 23.1 приведены результаты, полученные для некоторых таких систем. Эти данные показывают, что константа спаривания существенным образом зависит от последовательности оснований в димере и что АТ- и АУ-пары значительно менее стабильны, чем GC-пары.

ИССЛЕДОВАНИЕ БОЛЕЕ ДЛИННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Более длинные олигонуклеотидные комплексы достаточно стабильны, чтобы за их образованием можно было следить по изменению поглощения или кругового дихроизма. И

Таблица 23.1
КОНСТАНТЫ ОБРАЗОВАНИЯ ДИНУКЛЕОТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ,
ОПРЕДЕЛЕННЫЕ МЕТОДОМ ЯМР^{1),2)}

Комплекс	Температура, °C	K, M^{-1}
pdGpdC · pdGpdC	2	$7,8 \pm 0,7$
pdCpdG · pdCpdG	2	$3,0 \pm 0,5$
pdGpdG · pdCpdC	2	$9,1 \pm 1,1$
pdGpdC · pdGpdC	25	< 2
pdGpdT · pdApdC	2	< 3
CpG · CpG	4	$14,0 \pm 2,5$
GpU · ApC	1	≤ 14
GpC · GpC	4	≥ 14

¹⁾ Данные взяты из работы Krugh T. R., Mooberry E. S., Chiao Y. C. C.

²⁾ Все образцы исследовались при низкой концентрации соли.

Таблица 23.2

ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ
ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ,
ОПРЕДЕЛЕННАЯ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ¹⁾

Комплекс	Предпо- лагаемая длина спирали	Температура плавления (в °C) при concentra- ции олигонуклеотидов		
		10 мкМ	25 мкМ	100 мкМ
1 $A_3U_3 \cdot A_3U_3$	6	—	— 14	— 9
2 $A_2GCU_2 \cdot A_2GCU_2$	6	20	—	28
3 $A_4G_2 \cdot C_2U_4$	6	14 ²⁾	—	23 ²⁾
4 $A_2CGU_2 \cdot A_2CGU_2$	6	11	16	22
5 $U_2CGA_2 \cdot U_2CGA_2$	6	2	—	11
6 $A_4CG \cdot CGU_4$	6	— 14 ²⁾	—	— 1 ²⁾
7 $A_4U_4 \cdot A_4U_4$	8	5	8	12
8 $A_4CU_3 \cdot A_3GU$	8	15 ²⁾	18 ²⁾	23 ²⁾
9 $A_3CGU_3 \cdot A_3CGU_3$	8	—	32	35
10 $A_3GCU_3 \cdot A_3GCU_3$	8	35	—	42
11 $A_5U_4 \cdot A_5U_4$	8 ³⁾	—	9	14
12 $A_4CU_4 \cdot A_4CU_4$	8 ⁴⁾	—	—	— 5
13 $A_4GU_4 \cdot A_4GU_4$	8 ⁴⁾	—	— 1	5
14 $A_5U_5 \cdot A_5U_5$	10	18	20	23
15 $A_5CU_4 \cdot A_4GU_5$	10	26 ²⁾	29 ²⁾	33 ²⁾
16 $A_4UAU_4 \cdot A_4UAU_4$	10	22	—	28
17 $A_4CGU_4 \cdot A_4CGU_4$	10	—	39	43
18 $A_6U_5 \cdot A_6U_5$	10 ³⁾	—	23	27
19 $A_5CU_5 \cdot A_5CU_5$	10 ⁴⁾	—	5	10
20 $A_5GU_5 \cdot A_5GU_5$	10 ⁴⁾	—	15	18
21 $A_4GCU_4 \cdot A_4GCU_4$	10	41	—	47
22 $A_4GC_2U_4 \cdot A_4GC_2U_4$	10 ⁴⁾	~ 20	—	—
23 $A_4GC_3U_4 \cdot A_4GC_3U_4$	10 ⁴⁾	11	—	—
24 $A_4GC_4U_4 \cdot A_4GC_4U_4$	10 ⁴⁾	7	—	—
25 $A_6U_6 \cdot A_6U_6$	12	26	29	32
26 $A_7U_7 \cdot A_7U_7$	14	36	37	39

¹⁾ Данные взяты из разных источников. См., например, Martin F., Uhlenbeck O., Doty P., J. Mol. Biol., 57, 201, 1971; Uhlenbeck O., Borer P., Dengler B., Tinoco I., Jr., J. Mol. Biol., 73, 483, 1973; Gralla J., Grothers D., J. Mol. Biol., 73, 497, 1973.

²⁾ Эти значения температуры плавления соответствуют вдвое большим концентрациям цепей, чем указано в таблице, поскольку образование комплексов протекает согласно схеме $A + B \rightarrow C$, а не $2A \rightarrow A_2$ (см. текст).

³⁾ Неспаренные основания на концах комплексов предположительно участвуют в стэкинг-взаимодействии с двойной спиралью (см. рис. 23.3).

⁴⁾ Неспаренные основания, по-видимому, образуют петлю в центре комплексов (см. рис. 23.3).

лишь в немногих случаях количество имеющегося в распоряжении образца оказывается достаточным для исследований методом ЯМР. В табл. 23.2 приведены некоторые результаты многочисленных исследований комплексов олигомеров оптически методами. В таблице суммированы данные лишь по олигорибонуклеотидам, поскольку эти данные значительно более обширны, чем для дезокси-аналогов. На рис. 23.3 изображены предпо-

Основания, которые не могут образовывать в данном комплексе комплементарные пары, создают внутренние петли, значительно понижающие стабильность комплекса (ср. комплексы 12 и 19 с комплексами 7, 14 и 25 в табл. 23.2). Более того, оказывается важным то, какое основание образует петлю (ср. комплексы 13 и 20 с комплексами 12 и 19). Влияет на стабильность и размер внутренней петли: чем больше петля, тем менее стабилен комплекс (ср. комплексы 21 — 24; см. также рис. 23.3).

Стабильность совершенных комплементарных комплексов существенным образом зависит от нуклеотидного состава. Присутствие даже одной GC-пары в комплексе из AU-пар заметно увеличивает T_m последнего (ср. комплексы 8 и 15 с комплексами 7 и 14 в табл. 23.2); две GC-пары оказывают еще большее влияние (ср. комплексы 9, 10 и 17 с комплексами 7, 14 и 16).

Очень важной оказывается и последовательность оснований. В табл. 23.2 включены данные о пяти разных гексануклеотидных комплексах с нуклеотидным составом $A_4U_4C_2G_2$ (комплексы 2-6); значения T_m для этих комплексов при концентрации 100 мкМ существенно различаются и лежат в интервале от -1 до 28°C . Таким образом, для того чтобы судить о том, какие структуры для молекул РНК или их фрагментов будут наиболее стабильными, следует учитывать детали их последовательности.

В табл. 23.3 приведены значения T_m некоторых структур со шпильками, образованных при внутримолекулярном спаривании оснований. Такие структуры можно отличить от межмолекулярных комплексов по отсутствию зависимости их оптических свойств от концентрации. Кроме того, разграничение можно провести, определив молекулярную массу препарата методом равновесного центрифугирования. Выяснение типа образующихся структур является серьезной проблемой, поскольку любая последовательность, которая способна образовывать шпильки, может образовывать и межмолекулярный комплекс с петлей в центре. Например,

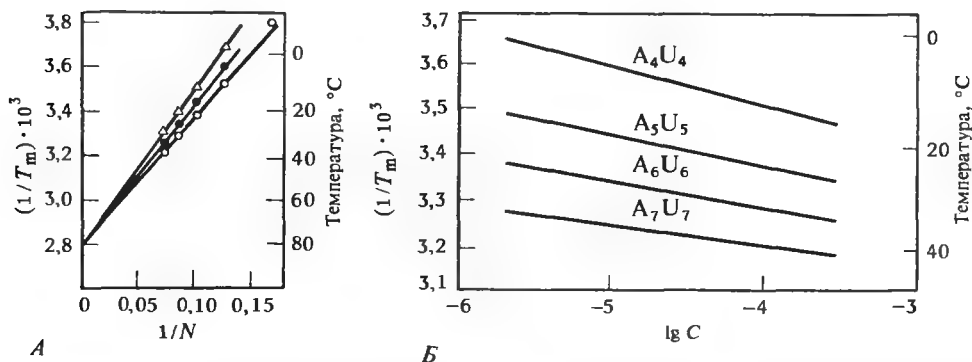


РИС. 23.4. Плавление олигонуклеотидов ряда A_nU_n . А. Зависимость $1/T_m$ от обратной длины ($N = 2n$). Измерения проводились при концентрации цепей 10^{-3} M ($\circ$), 10^{-4} M ($\bullet$) и 10^{-5} M (Δ). Б. Зависимость $1/T_m$ от концентрации для различных длин цепей. Все результаты получены при рН 7,0 в 1 М NaCl. (Martin F. N., Uhlenbeck O. C., Doty P., J. Mol. Biol., 57, 201, 1972.)

Таблица 23.3

ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ШПИЛЕК,
ОПРЕДЕЛЕННАЯ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ¹⁾

Комплекс	Предполагаемая длина спирали	Температура плавления (в °С) при concentra- ции олигонуклео- тидов 10 мкМ
$\begin{array}{c} 5' \text{ AAAAG}^{\text{C}} \\ \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \\ 3' \text{ UUUUC}^{\text{C}} \end{array}$	10	20
$\begin{array}{c} 5' \text{ AAAAG}^{\text{CC}} \\ \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \text{C} \\ 3' \text{ UUUUC}^{\text{CC}} \end{array}$	10	36
$\begin{array}{c} 5' \text{ AAAAAA}^{\text{C}} \\ \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \text{C} \\ 3' \text{ UUUUUU}^{\text{C}} \end{array}$	12 [†]	2
$\begin{array}{c} 5' \text{ AAAAAA}^{\text{CC}} \\ \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \text{C} \\ 3' \text{ UUUUUU}^{\text{CC}} \end{array}$	12	13
$\begin{array}{c} 5' \text{ AAAAAA}^{\text{CC}} \\ \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \text{C} \\ 3' \text{ UUUUUU}^{\text{CC}} \end{array}$	12	21
$\begin{array}{c} 5' \text{ AAAAAA}^{\text{CCC}} \\ \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \text{C} \\ 3' \text{ UUUUUU}^{\text{CCC}} \end{array}$	12	13

¹⁾ Данные взяты из разных источников (см. примечание к табл. 23.2).

Как следует из закона действующих масс, шпильки должны быть более выгодны при низких концентрациях. Напротив, межмолекулярный комплекс будет более стабилен при высоких концентрациях. В промежуточных случаях наиболее важным фактором, определяющим относительную стабильность шпилек или межмолекулярных комплексов, является размер петли. Образование петель в шпильках, состоящих менее чем из трех звеньев, невыгодно из-за стереохимических ограничений. Стабильность шпилек, определяемая по плавлению, достигает максимума при размере петли около шести — семи звеньев и затем, при увеличении размера петли, падает (табл. 23.3). Данные, полученные на модельных соединениях, не позволяют количественно определить влияние последовательности или нуклеотидного состава в петле на стабильность шпилек; однако эти данные ясно по-

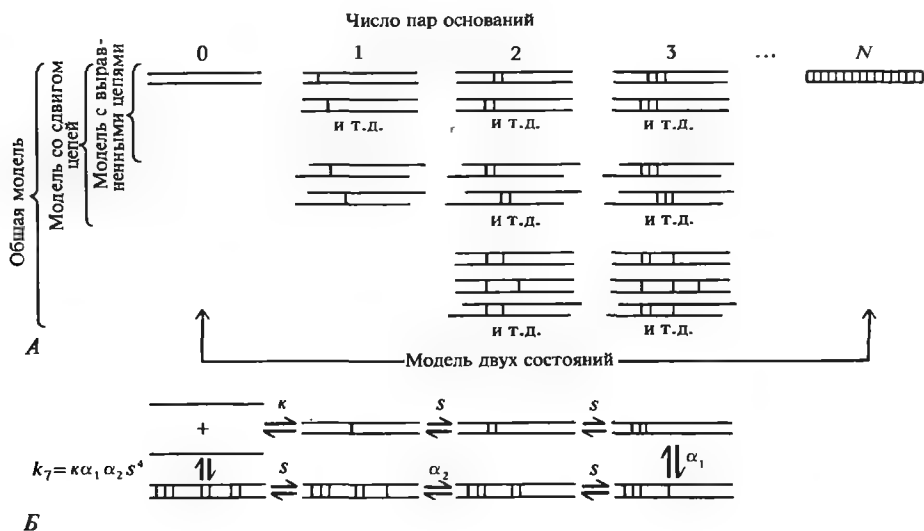


РИС. 23.5. Состояния комплекса, учитываемые в различных моделях плавления олигонуклеотидов. А. В модели с выравненными цепями рассматриваются лишь состояния с одной спиральной областью и считается, что сдвиг цепей друг относительно друга невозможен. Модель со сдвигом цепей (модель «застежка-молния») учитывает также и состояния, в которых цепи сдвинуты друг относительно друга (это может происходить в гомополимерах или в периодических последовательностях). Общая модель рассматривает, кроме того, состояния с несколькими спиральными областями. В модели двух состояний предполагается, что существуют лишь спираль из N пар оснований с выравненными цепями и состояние без спаривания оснований. Б. Некоторые переходы между состояниями, рассматриваемые в общей модели, которые поясняют смысл констант равновесия для образования определенных элементов структуры комплекса.

казывают, что упомянутые эффекты существенны и ими нельзя пренебрегать. Это вполне понятно, поскольку образование петель связано с изменениями не только в структуре фосфодиэфирного остова, но также и стэкинга оснований в одноцепочечной области.

Далее мы попытаемся объяснить данные, приведенные в табл. 23.2 и 23.3, и покажем, как с их помощью можно найти термодинамические параметры образования пар оснований двойной спирали и петель. Мы продемонстрируем, как эти параметры используются при анализе возможных конформаций произвольных заданных последовательностей. Наконец, мы покажем, как можно использовать экспериментальные данные по стабильности модельных олигонуклеотидных систем для предсказания наиболее стабильной вторичной структуры РНК, для которой известна лишь последовательность оснований.

МОДЕЛИ ОБРАЗОВАНИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА

Рассмотрим прежде всего последовательные этапы образования комплекса из двух комплементарных одиночных цепей (рис. 23.5). Начнем со случая, когда обе цепи представлены в равных концентрациях и временно будем пренебрегать влиянием последовательности и состава оснований на стабильность комплекса. Константа равновесия κ для инициации комплекса должна быть отлична от константы s увеличения длины уже существующей спиральной области на одну пару оснований. Последняя зависит от энтропии и энтальпии образования еще одного стэкинга между существующей и новой спиральной парой, а также от энергии образования самой пары. Константа κ должна учитывать

изменение энтропии, сопровождающее связывание двух цепей в один комплекс (эта константа часто записывается как функция s : $\kappa = \sigma s$).

Константа равновесия для нуклеации второй спиральной области не равна κ , поскольку цепи уже соединены вместе. Это некая новая константа α_j , которая зависит от размера петли между первой спиральной областью и второй областью инициации. Константа равновесия для образования данной уникальной конфигурации с j парами оснований равна

$$k_j = \kappa \left(\prod_{l=1}^{\gamma-1} \alpha_l \right) s^{j-\gamma} \quad (23.5)$$

где γ — число спиральных областей, а $\gamma - 1$ равно общему числу образованных петель. На рис. 23.5,Б изображена конфигурация с семью парами оснований и двумя петлями.

Для полного статистико-термодинамического описания образования комплекса используется понятие статистической суммы системы, определяемой как $q = \sum_i e^{-G_i/RT}$,

где G_i — свободная энергия i -й конфигурации (одно- или двухцепочечной), а сумма берется по всему набору конфигураций. Поскольку нас интересует только двухцепочечный комплекс, более удобно иметь дело с конформационной статистической суммой. При этом энергия всех состояний отсчитывается относительно энергии одиночных цепей. Используя тот факт, что $\Delta G_i = -RT \ln K_i$ (где через K_i обозначена константа равновесия для реакции образования i -й конфигурации из разделенных цепей), мы получаем

$$q_\kappa = \sum_i e^{-\Delta G_i/RT} = \sum_i K_i \quad (23.6)$$

Определенная таким образом статистическая сумма почти идентична по форме статистической сумме q , использованной в гл. 20 для описания перехода спираль — клубок в полипептидах (она в действительности равна $q - 1$). Концентрация цепей не входит в выражение (23.6). Чтобы вычислить количество образованных комплексов, нужно использовать уравнение равновесия для реакции второго порядка, считая при этом, что константа равновесия равна q_κ , и учитывая реальные концентрации цепей. Мы продемонстрируем это в следующем разделе.

Обратите внимание, какую цену приходится платить за использование конформационной статистической суммы: параметры κ , α_j и s , входящие в K_i , являются теперь функцией состояния одиночных цепей. Мы знаем, однако, что свойства одиночных цепей слабо зависят от температуры, концентрации соли или длины цепи. Поэтому вполне оправданным является предположение, что значения этих параметров, определенные из анализа свойств двойных спиралей, почти целиком обусловлены термодинамическими свойствами пар оснований и стэкинга в двойной спирали.

Получить достаточно простое выражение для q_κ в общем случае не удастся, однако для олигомеров не слишком большой длины такие аналитические выражения всегда существуют. При этом оказывается весьма полезным использовать экспериментальные результаты, подобные приведенным в табл. 23.2, чтобы исключить из рассмотрения заведомо нестабильные состояния, которые не могут дать заметного вклада в q_κ . Наиболее грубым приближением является модель «застежка-молния со сдвигом», предложенная Дж. Эпплквиستم и В. Дэмлом (J. Applequist, V. Damle). В этой модели не учитываются все конфигурации, в которых встречается более одного спирального участка. Такое приближение вполне оправдано для коротких цепей. Исключение зависящей от размера петли константы α_j приводит к очень большим упрощениям. В этом случае статистическая сум-

ма может быть записана в виде

$$q_k = \kappa \sum_{j=1}^N g_j(N) s^{j-1} \quad (23.7)$$

где суммирование ведется по всем возможным длинам спиральной области, $g_j(N)$ соответствует числу физически различных состояний s/j парами оснований в спиральной области, а через N обозначена длина одиночных цепей олигомера.

Модель «застежка-молния со сдвигом» является очень важной при анализе гомеолигомерных комплексов; в этом случае предполагается, что цепи в комплексе могут быть с заметной вероятностью сдвинуты друг относительно друга при условии, что доля звеньев, участвующих в образовании пар, невелика. По мере того как условия смещаются в область большой стабильности комплекса, все больше молекул в растворе принимают конформации с максимальным возможным числом пар оснований, что несовместимо со сдвигом цепей друг относительно друга. На рис. 23.6 приведены некоторые результаты, полученные с помощью модели со сдвигом цепей, иллюстрирующие это положение. В гетероолигомерах конфигурации со смещением цепей становятся крайне маловероятными, поскольку в этом случае возможно образование лишь очень коротких спиральных участков; как видно из рис. 23.6, образование таких участков очень маловероятно. В этом случае можно воспользоваться даже более простым приближением.

Если мы будем учитывать лишь состояния с несмещенными цепями, то число физически различных состояний s/j парами оснований для олигомеров из N звеньев будет равно $g_j(N) = N - j + 1$, в чем можно убедиться из анализа рис. 23.5. В этом случае статистическая сумма может быть записана в виде суммы ряда (как было сделано в гл. 20):

$$q_k = \kappa \sum_{j=1}^N (N - j + 1) s^{j-1} \quad (23.8a)$$

$$= \kappa \left[(N + 1) \sum_{j=1}^N s^{j-1} - \sum_{j=1}^N j s^{j-1} \right] \quad (23.8b)$$

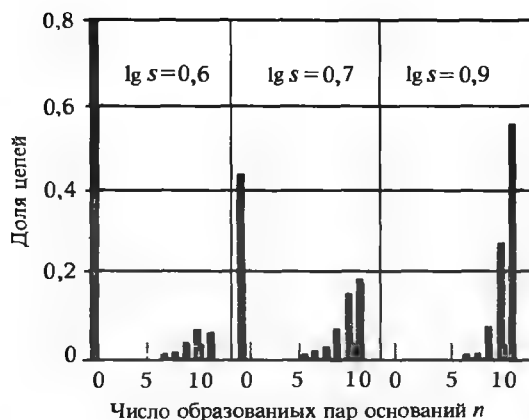


РИС. 23.6. Анализ степени заполнения состояний для модели со сдвигом цепей. Рассматривается образование комплекса с одиннадцатью потенциальными парами оснований. Хотя расчеты приведены для кислой формы двойной спирали $(\text{AH}^+)_{11} \cdot (\text{AH}^+)_{11}$, полученные результаты являются общими для этой модели. Константа равновесия s для процесса увеличения длины спиральной области на одну пару оснований рассматривается в тексте. Из этих результатов следует, что модель двух состояний является довольно хорошим приближением для этого случая. (Applequist J., Damle V., J. Am. Chem. Soc., 87, 1450, 1965.)

Первая сумма в выражении (23.8б) представляет собой просто сумму членов геометрической прогрессии, а вторая выражается через эту сумму как $\partial(\sum_j s^j)/\partial s$. Конечный результат можно представить в виде

$$q_k = \kappa[s^{N+1} - (N+1)s + N]/(s-1)^2 \quad (23.9)$$

Отметим, что при $s \gg 1$ выражение (23.9) принимает вид

$$q_k \cong \kappa s^{N-1} \quad (23.10)$$

С физической точки зрения (23.10) соответствует предельной степени упрощения схемы возможных состояний, иллюстрируемой рис. 23.5. Для схемы, в которой учитываются лишь два состояния, константа равновесия для образования комплекса $K_{\text{равн}}$ равна κs^{N-1} . Результаты, приведенные на рис. 23.6, показывают, что это приближение вполне допустимо.

АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ: САМОКОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ОЛИГОМЕРЫ

Единственным методом, который позволяет отличить друг от друга индивидуальные конфигурации, которые учитываются в статистической сумме q_k , является метод ЯМР. Поскольку в настоящее время подавляющее большинство работ основано на использовании оптических методов, необходимо связать q_k со средними структурными параметрами, которые извлекаются из данных, основанных на измерениях КД или поглощения. Таким параметром, удобным для работы, является средняя доля спаренных оснований $X_{\text{осн}}$. Хотя величину $X_{\text{осн}}$ нельзя прямо измерить, ее можно найти, регистрируя, например, поглощение. Простейшее предположение состоит в том, что измеряемый параметр A является линейной функцией количества спаренных оснований. Экспериментальные данные, полученные при исследовании равновесия между одио- и двухцепочечными формами, интерпретируются на основании уравнения

$$A = \chi' A_{\text{д.с.}} + (1 - \chi') A_{\text{о.ц.}} \quad (23.11)$$

где χ' является подгоночным параметром, а $A_{\text{д.с.}}$ и $A_{\text{о.ц.}}$ — характеристики совершенной двойной спирали и смеси одиночных цепей соответственно. Отсюда получаем следующее соотношение для χ' :

$$\chi' = (A - A_{\text{о.ц.}})/(A_{\text{д.с.}} - A_{\text{о.ц.}}) \quad (23.12)$$

Параметр χ' будет равен $X_{\text{осн}}$ в том случае, если спиральные участки имеют достаточную длину, так что зависимость A от длины спиральной области (иная, чем простая пропорциональность числу пар оснований в этой области) оказывается несущественной. Для тех случаев, когда необходимо учитывать точную зависимость поглощения от длины участков, можно получить более строгое уравнение для анализа экспериментальных данных. Обычно χ' измеряют, варьируя температуру. Поскольку плавление коротких спиралей происходит в широкой температурной области, при анализе экспериментальных данных следует учитывать зависимость $A_{\text{о.ц.}}$ и $A_{\text{д.с.}}$ от температуры.

Экспериментально определив $X_{\text{осн}}$, можно найти q_k . Напомним, что q_k является просто полной константой равновесия для образования всех структур со спаренными основаниями, M_2 , из самокомплементарных олигомеров M . Таким образом, для реакции $2M \rightleftharpoons M_2$

можно записать

$$q_k = (M_2)/(M)^2 = X/2(1 - X)^2 C_{\text{полн}} \quad (23.13)$$

где через $X = 2(M_2)/[2(M_2) + (M)]$ обозначена доля спаренных цепей, а через $C_{\text{полн}}$ — полная концентрация олигонуклеотидных цепей. Если справедливо приближение, в котором учитываются лишь два состояния, то $X = X_{\text{осн}} = \chi'$. В общем случае, однако, $X \neq X_{\text{осн}}$, поскольку в комплексе образуются не все возможные пары оснований; тогда следует ввести соотношение

$$X_{\text{осн}} = X f_{\text{осн}} \quad (23.14)$$

где через $f_{\text{осн}}$ обозначена средняя доля спаренных оснований.

Вернемся к уравнению (23.6) и отметим, что, поскольку индекс i соответствует перебору лишь структур со спаренными основаниями, K_i/q_k — это доля комплексов с i -й конфигурацией. Если мы сгруппируем вместе конфигурации, содержащие j пар оснований, используя соотношение (23.7), то получим, что

$$f_j = \kappa_{gj}(N) s^{j-1} / q_k \quad (23.15)$$

является долей комплексов, содержащих j пар оснований. Для среднего числа пар оснований в комплексе получаем

$$\begin{aligned} \langle n \rangle &= \sum_{j=1}^N j f_j = (1/q_k) \sum_{j=1}^N \kappa_{gj}(N) j s^{j-1} \\ &= \frac{1}{q_k} \frac{d}{ds} \sum_{j=1}^N \kappa_{gj}(N) s^j \\ &= (1/q_k) d(sq_k)/ds \end{aligned} \quad (23.16)$$

Доля спаренных оснований $f_{\text{осн}} = \langle n \rangle / N$, так что¹

$$\chi' \cong X_{\text{осн}} = X \langle n \rangle / N = (X/q_k N) d(sq_k)/ds \quad (23.17a)$$

Для реальной экспериментальной системы величина N известна, а X можно выразить через q_k и $C_{\text{полн}}$, решив квадратное уравнение (23.13). Это дает аналитическое выражение для χ' как функции q_k и $C_{\text{полн}}$:

$$\chi' = \left(\frac{1 + 4q_k C_{\text{полн}} - \sqrt{1 + 8q_k C_{\text{полн}}}}{4q_k^2 C_{\text{полн}} N} \right) \frac{d}{ds} (sq_k) \quad (23.17b)$$

Для статистической суммы q_k можно использовать выражения (23.9) или (23.10). Тогда наблюдаемое поглощение находящихся в равновесии самокомплементарных олигонуклеотидов можно вычислить, зная зависимость s и κ от внешних условий. И наоборот, можно попытаться определить s и κ по результатам измерений поглощения.

¹ Преимущество записи константы нуклеации в виде as состоит в том, что в этом случае соотношение (23.17a) приобретает особенно простой вид: $\chi' \cong X_{\text{осн}} = (X/N) d(\ln q_k)/d(\ln s)$. Отметим также, что в пределе модели двух состояний соотношение (23.17a) немелленио приводит к $X_{\text{осн}} = X$.

АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ: ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ШПИЛЕК

Данные, приведенные в табл. 23.2, касаются и другого типа равновесия, которое не описывается уравнением (23.13). Для комплекса между двумя комплементарными неодинаковыми олигомерами, присутствующими в растворе в равных концентрациях (такими, как $A_4G_2 + C_2U_4 \rightleftharpoons A_4G_2 \cdot C_2U_4$), схема реакции имеет вид $A + B \rightleftharpoons C$. В этом случае

$$q_k = (C)/(A)(B) = 2X/(1 - X)^2 C_{\text{полн}} \quad (23.18)$$

где $X = 2(C)/[(A) + (B) + 2(C)]$. Уравнение (23.18) легко проверить, используя определение величины X и имея в виду, что цепи A и B присутствуют в равных концентрациях, т.е. $(A) = (B)$, а $1/4[(A) + (B)]^2 = (A)(B)$.

Если для рассматриваемой системы модель двух состояний является достаточно хорошим приближением, наблюдаемое значение T_m соответствует $X = 0,5$. Уравнения (23.13) и (23.18) дают в этом случае

$$q_k(T_m) = 1/C_{\text{полн}} \text{ для самокомплементарных олигомеров} \quad (23.19a)$$

$$q_k(T_m) = 4/C_{\text{полн}} \text{ для спаривания комплементарных олигомеров} \quad (23.19b)$$

Эти выражения показывают, что при сравнении температур плавления таких спиралей нужно сопоставлять данные для самокомплементарных олигомеров с соответствующими данными для комплементарных цепей, взятых в учетверенной концентрации.

В табл. 23.3 приведены данные, касающиеся внутримолекулярного равновесия между одноцепочечной формой олигонуклеотидов и образованными из них шпильчатыми структурами. Соотношения (23.8) — (23.10), (23.16) и (23.17) были получены для межмолекулярных комплексов, но они справедливы и для внутримолекулярных комплексов. При построении конформационной статистической суммы мы исключили из нее зависимость от концентрации. Поэтому для описания образования шпилек ($S \rightleftharpoons H$, где S соответствует одиночной цепи, а H — структуре со шпилькой) нужно лишь выразить условие равновесия через долю структур со шпилькой $X = (H)/[(S) + (H)]$:

$$q_k = X/(1 - X) \quad (23.20)$$

Все остальные соотношения для величин X , $X_{\text{осн}}$ и χ' остаются справедливыми для этого случая. Однако при вычислении q_k следует помнить, что κ_l (параметр нуклеации при образовании шпилек) является функцией размера петли l и не имеет ничего общего с константой κ для образования межмолекулярного комплекса.

Для упрощения конформационной статистической суммы можно использовать простые качественные соображения. Например, для такой последовательности, как $A_4GC_6U_4$, очень маловероятно образование структуры, в которой присутствовали бы AU -пары, а пара GC находилась в открытом состоянии. Будем считать, что константа κ_5 относится к замыканию петли из 5 звеньев парой GC . Константа равновесия s_{AG} для стэкинга AU -пары с GC -парой отлична от константы s_{AA} для стэкинга двух AU -пар. Поскольку мы считаем, что шпилька замыкается GC -парой, необходимо учитывать лишь конфигурации, содержащие такую GC -пару и прилегающие к ней соседние пары. Исходя из соотношения (23.7) и имея в виду, что $g_j(N) = 1$ для всех j , поскольку мы фиксировали размер петли и направление роста спиральной области, мы можем в хорошем приближении записать конформационную статистическую сумму как

$$q_k = \kappa_5 \left(1 + s_{AG} \sum_{j=0}^3 s_{AA}^j \right) \quad (23.21)$$

Если s_{AA} и s_{AG} известны из независимых экспериментов, определив стабильность шпильки, можно найти параметр нуклеации κ_s .

РАСЧЕТ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ОТДЕЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СПИРАЛИ

Чтобы найти термодинамические параметры отдельных взаимодействий в спирали, можно использовать множество разных способов анализа данных по температурам плавления олигонуклеотидов. Мы ограничимся здесь анализом модельных комплексов с одним, наиболее предпочтительным взаимным расположением цепей. В этом случае свободную энергию образования спирали $\Delta G_{\text{полн}}$ можно записать как

$$\Delta G_{\text{полн}} = \sum \Delta G_{\text{нукл}} + \sum \Delta G_{\text{рост}} \quad (23.22)$$

где первая сумма соответствует усреднению по всем отдельным способам образования зародыша ($\Delta G_{\text{нукл}}$ определяется значениями κ или α_r), а вторая — суммированию по всем актам роста спиральной области ($\Delta G_{\text{рост}}$ определяется значениями s), необходимым для получения конечной спиральной структуры. Аналогичным образом определяются энтропии и энтальпии, соответствующие каждому отдельному взаимодействию.

Чтобы найти значение $\Delta G_{\text{рост}}$ для определенного взаимодействия, лучше всего сопоставить температуры плавления двух олигомерных комплексов (1 и 2), имеющих максимальное сходство и различающихся лишь числом интересующих нас взаимодействий. Если оба олигомера самокомплементарны, уравнение (23.19б) определяет T_m для обоих комплексов. Подберем или экстраполируем экспериментальные условия таким образом, чтобы температуры плавления двух комплексов совпадали. Тогда

$$q_k^{(1)} C_{\text{полн}}^{(1)} = q_k^{(2)} C_{\text{полн}}^{(2)} \quad \text{при } T_m^{(1)} = T_m^{(2)} = T \quad (23.23)$$

Поскольку свободная энергия $\Delta G_{\text{полн}}$ есть просто $-RT \ln q_k$, разность свободных энергий равна

$$\begin{aligned} \Delta \Delta G_{\text{полн}} &= \Delta G_{\text{полн}}^{(1)} - \Delta G_{\text{полн}}^{(2)} = -RT \ln q_k^{(1)} + RT \ln q_k^{(2)} \\ &= RT (\ln C_{\text{полн}}^{(1)} - \ln C_{\text{полн}}^{(2)}) \end{aligned} \quad (23.24)$$

На рис. 23.7 приведен пример использования уравнения (23.24). Применение этого подхода облегчается тем, что зависимость $1/T_m$ от $\ln C_{\text{полн}}$ линейна. Эту линейность нетрудно объяснить. Для олигомерного комплекса из соотношений (23.19а, б) следует, что

$$\Delta G_{\text{полн}}/RT_m = -\ln q_k = \ln(\gamma'' C_{\text{полн}}) = (\Delta H_{\text{полн}}/RT_m) - \Delta S_{\text{полн}}/R \quad (23.25)$$

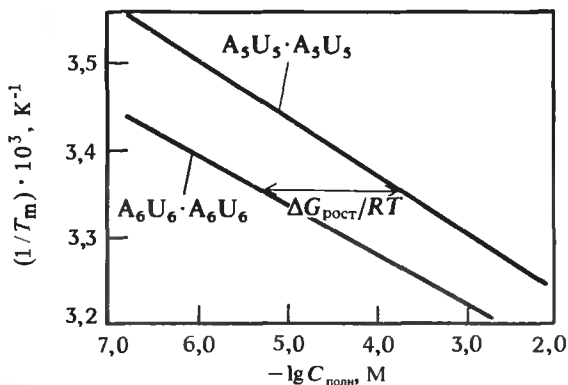
где $\Delta G_{\text{полн}}$, $\Delta H_{\text{полн}}$ и $\Delta S_{\text{полн}}$ соответствуют образованию совершенного комплекса из отдельных цепей. Константа γ'' равна 1 для самокомплементарных олигомеров и 4 для комплементарных цепей. Отметим, что уравнение (23.25) идентично по форме полученному эмпирически уравнению (23.4) при $A' = \Delta S_{\text{полн}}/\Delta H_{\text{полн}}$ и $B' = -R/\Delta H_{\text{полн}}$.

После того как величина $\Delta \Delta G_{\text{полн}}$ определена экспериментально с помощью соотношения (23.24), ее нужно связать с микроскопическими константами равновесия для отдельных взаимодействий. Для двух структур, у которых акты инициации спирали идентичны, в рамках модели двух состояний получаем из соотношения (23.22).

$$\Delta \Delta G_{\text{полн}} = \Delta \sum \Delta G_{\text{рост}} \quad (23.26)$$

Далее, каждый член $\Delta G_{\text{рост}}$ можно представить в виде $-RT \ln s_i$, где s_i — константа рав-

РИС. 23.7. Определение изменения свободной энергии при добавлении АУ-пары к уже существующему спиральному участку. Приведены зависимости для двух разных олигомеров от концентрации цепей. Определение величины $\Delta\Delta G_{\text{полн}}$ основывается на соотношении (23.24). Поскольку комплекс A_6U_6 имеет две дополнительные АУ-пары, константа равновесия для присоединения одной из них равна $s_{AA} = \exp(-\Delta\Delta G_{\text{полн}}/2RT)$ [см. соотношения (23.26) — (23.28)]. (Gralla J., Crothers D. M., J. Mol. Biol., 73, 497, 1973.)



новесия для образования i -й пары оснований по соседству с уже существующей парой. Таким образом, для олигомерного комплекса с $N + 1$ парой оснований $\Delta G_{\text{рост}} = -RT \ln \Pi_i s_i$ (где произведение берется по i от 1 до N). При сопоставлении двух спиралей длиной N_1 и N_2 звеньев уравнение (23.24) дает

$$\Delta\Delta G_{\text{полн}} = -RT \ln(q_k^{(1)}/q_k^{(2)}) = -RT \ln\left(\prod_{j=1}^{N_1} s_j^{(1)} / \prod_{k=1}^{N_2} s_k^{(2)}\right) \quad (23.27)$$

Проиллюстрируем применение уравнения (23.26) на практике. На рис. 23.7 представлены данные для двух олигомеров. В этой системе додекамер (комплекс 1) содержит два дополнительных стэкинга АА, образование которых характеризуется константой s_{AA} . Поэтому

$$\Delta\sum \Delta G_{\text{рост}} = -RT \ln s_{AA}^2 \quad (23.28)$$

Предположим, что мы сопоставляем комплексы $A_2GCU_2 \cdot A_2GCU_2$ и $A_2CGU_2 \cdot A_2CGU_2$. Тогда

$$\Delta\sum \Delta G_{\text{рост}} = -RT \ln(s_{AG}s_{GC}s_{CU}/s_{AC}s_{CG}s_{GU}) \quad (23.29)$$

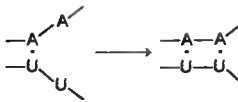
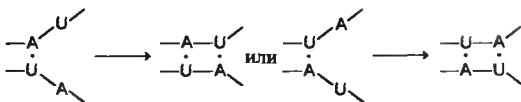
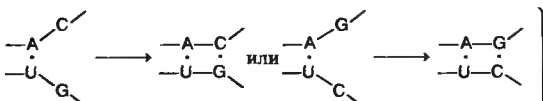
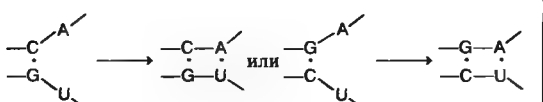
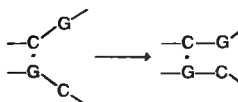
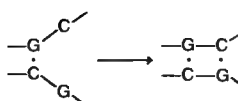
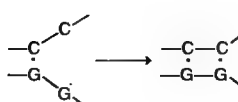
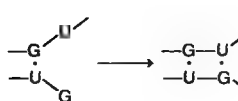
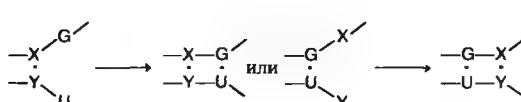
Если бы в нашем распоряжении имелись данные для достаточного числа олигомеров, можно было бы написать систему уравнений для определения констант, характеризующих все десять возможных взаимодействий ближайших соседей. Однако на основании имеющихся в настоящее время данных получить полное решение этой задачи нельзя, хотя эта область быстро развивается. В табл. 23.4 суммированы наиболее надежные из имеющихся данных для параметров, характеризующих отдельные взаимодействия. Отметим, что $\Delta G_{\text{рост}}$ зависит от концентрации соли и температуры, и для сравнения данных для двух олигомеров в соответствии с уравнением (23.26) нужна экстраполяция к одинаковым условиям. Для такого сравнения были выбраны стандартные условия: 25°C, 1 M Na⁺.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНТАЛЬПИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДАХ

При наличии достаточного количества данных величины $\Delta H_{\text{полн}}$ для олигонуклеотидных комплексов можно найти с помощью уравнения (23.25), представленного в форме

$$\Delta H_{\text{полн}}/R = d(\ln C_{\text{полн}})/d(1/T_m) \quad (23.30)$$

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ
ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ ПАРЫ ОСНОВАНИЙ
РЯДОМ С УЖЕ СУЩЕСТВУЮЩИМ СПИРАЛЬНЫМ УЧАСТКОМ^{1), 2)}

Реакция	ΔH^0 , ккал	ΔS^0 , ккал · град ⁻¹	ΔG^0 при 25°C, ккал
	-8,2	-0,0235	-1,2
	-6,5	-0,0164	-1,6
	-5,9	-0,0127	-2,1
			
	-13,0	-0,0335	-3,0
	-14,7	-0,0349	-4,3
	-13,7	-0,0298	-4,8
	—	—	0,3
	—	—	0,0

¹⁾ Borer P. et al., J. Mol. Biol., 86, 843, 1974.

²⁾ При анализе экспериментальных данных предполагалось, что стандартная (для концентрации цепей 1 M) свободная энергия инициации спирали при 25°C равна +6,0 ккал для AU-пар и +5,0 ккал для GC-пар. В последней реакции X и Y — любая из уотсон-криковских пар.

При этом предполагается, что $d\Delta H_{\text{полн}}/d(1/T_m)$ и $d\Delta S_{\text{полн}}/d(1/T_m) \cong 0$. Определенная отсюда величина $\Delta H_{\text{полн}}$ равна $\Delta H_{\text{нукл}} + \sum \Delta H_{\text{рост}}$ для всех взаимодействий (где индекс «нукл» отвечает нуклеации комплекса, а «рост» — его росту). Решая линейные уравнения, полученные на основании исследований различных олигомерных комплексов, можно найти $\Delta H_{\text{рост}}$ для отдельных взаимодействий. Зная $\Delta H_{\text{рост}}$ и $\Delta G_{\text{рост}}$, нетрудно определить $\Delta S_{\text{рост}}$.

Термодинамические параметры можно получить также из непосредственного анализа кривых плавления для отдельных олигомерных комплексов. Поскольку $\Delta G_{\text{полн}} = -RT \ln q_k = \Delta H_{\text{полн}} - T\Delta S_{\text{полн}}$, для полного изменения энтальпии применимо обычное соотношение Вант-Гоффа

$$\left[\partial(\ln q_k) / \partial T \right]_{C_{\text{полн}}} = (1/q_k)(\partial q_k / \partial X)_{C_{\text{полн}}} (\partial X / \partial T)_{C_{\text{поли}}} = \Delta H_{\text{полн}} / RT^2 \quad (23.31)$$

Величину $(1/q_k)(\partial q_k / \partial X)_{C_{\text{полн}}}$ можно оценить при $T = T_m$, поскольку в этих условиях $X \cong 0,5$. Из соотношений (23.13), (23.18) и (23.20) легко получить, что при $T = T_m$

$$(\partial X / \partial T)_{C_{\text{полн}}} = \Delta H_{\text{полн}} / \gamma' RT_m^2 \quad (23.32)$$

где $\gamma' = 4$ для образования внутримолекулярных шпилек и $\gamma' = 6$ для комплексов из комплементарных или самокомплементарных цепей. Величина $\Delta H_{\text{полн}}$ в этом соотношении представляет собой полную кажущуюся энтальпию образования межмолекулярного комплекса или шпильки. В рамках модели двух состояний имеется лишь один (эффективный) способ образования зародыша спирали, так что $\Delta H_{\text{полн}} = \Delta H_{\text{нукл}} + \sum \Delta H_{\text{рост}}$. В частном случае, когда энтальпия нуклеации равна нулю и все взаимодействия пар оснований одинаковы, $\Delta H_{\text{полн}} = (N - 1) \Delta H_{\text{рост}}$. На практике, однако, значения энтальпии, определенные из соотношений (23.32) и (23.30), не всегда хорошо согласуются между собой. Уравнение (23.32) дает более низкие величины и, по-видимому, является менее надежным.

И наконец, последним способом нахождения термодинамических параметров является экстраполяция данных по плавлению очень длинных гомополимеров. При образовании внутримолекулярных шпилек $\Delta G_{\text{поли}}(T_m) = 0$ и температура плавления T_m^∞ структур с длинными шпильками в очень хорошем приближении равна

$$T_m^\infty = N \Delta H_{\text{рост}} / N \Delta S_{\text{рост}} = \Delta H_{\text{рост}} / \Delta S_{\text{рост}} \quad (23.33)$$

поскольку вклад нуклеации в этом случае пренебрежимо мал. Для образования гомополимерной шпильки, содержащей N пар,

$$T_m = [(N - 1) \Delta H_{\text{рост}} + \Delta H_{\text{нукл}}] / [(N - 1) \Delta S_{\text{рост}} + \Delta S_{\text{нукл}}] \quad (23.34)$$

Из этих двух уравнений имеем

$$1/T_m = (1/T_m^\infty) + (\Delta S_{\text{нукл}} - \Delta H_{\text{нукл}}/T_m^\infty) / [(N - 1) \Delta H_{\text{рост}} + \Delta H_{\text{нукл}}] \quad (23.35)$$

Эквивалентное выражение можно получить и для межмолекулярных комплексов. Из этого соотношения следует, что для набора гомологичных олигомеров зависимость $1/T_m$ от $1/N$ должна быть приблизительно линейна (рис. 23.4А). Отметим, что соотношение (23.35) похоже по форме на полученное эмпирически соотношение (23.3) (они почти совпадают при малых $\Delta H_{\text{нукл}}$).

НУКЛЕАЦИЯ СПИРАЛИ; ОБРАЗОВАНИЕ ПЕТЕЛЬ И ШПИЛЕК

Для того чтобы вычислить T_m или $\Delta G_{\text{полн}}$ образования межмолекулярного комплекса или шпильки, необходимо учесть свободную энергию и нуклеации, и роста. Способ определения последнего параметра рассмотрен в предыдущем разделе. Параметры нуклеации, однако, трудно найти по следующим двум причинам. Из выражения для статистической суммы видно, что в случае простых последовательностей ошибки в определении s должны перемножаться и вести к значительным ошибкам в k , если пытаться определить эту величину из наблюдаемого суммарного изменения ΔG^0 для всего комплекса.

В случае образования комплекса из изолированных цепей для величин k_{AU} и k_{GC} были получены оценки $4 \cdot 10^{-5}$ и $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}^{-1}$ соответственно, что отвечает $\Delta G_{\text{нукл}} = +6$ и $+5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Первая величина применима лишь к олигомерам, не содержащим GC-пар, поскольку даже единственная GC-пара всегда, по-видимому, является наиболее предпочтительным местом нуклеации.

Чтобы найти энтропию образования комплекса, $\Delta H_{\text{нукл}}$ было принято равным нулю, поскольку для образования водородных связей в воде (дающего главный вклад в энергию нуклеации) энтальпия пренебрежимо мала. Таким образом, $\Delta G_{\text{нукл}} = -T\Delta S_{\text{нукл}}$. Это и другие приближения обуславливают некоторую неопределенность термодинамических параметров, приведенных в табл. 23.4. Однако с помощью этих параметров можно довольно точно предсказать T_m для РНК, которые не использовались при составлении данной таблицы. Комбинируя соотношения (23.22) и (23.25) и используя равенство $\Delta G_{\text{рост}} = \Delta H_{\text{рост}} - T\Delta S_{\text{рост}}$, можно показать, что

$$(1/T_m)(\sum \Delta H_{\text{рост}}) = \Delta S_{\text{нукл}} + \sum \Delta S_{\text{рост}} + R \ln \gamma^{\text{C}} C_{\text{полн}} \quad (23.36)$$

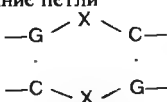
Это соотношение позволяет вычислить T_m комплекса (в градусах Кельвина).

Для свободной энергии образования петли или шпильки можно записать такие же выражения, как и в случае образования межмолекулярного комплекса. Для шпильки, как и ранее, $\Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{\text{нукл}} + \sum \Delta G_{\text{рост}}$. Здесь, однако, $\Delta G_{\text{полн}} = 0$ при температуре T_m , поскольку процесс образования является внутримолекулярным. Если $\Delta G_{\text{рост}}$ известно из данных для линейных цепей, можно определить $\Delta G_{\text{нукл}}$ при $T = T_m$. В табл. 23.5 приведены имеющиеся к настоящему времени данные относительно $\Delta G_{\text{нукл}}$. Внутренние двухцепочечные петли могут быть рассмотрены аналогичным образом. Например, сравним комплексы $A_4U_4 \cdot A_4U_4$ и $A_4CU_4 \cdot A_4CU_4$. Разница в $\Delta G_{\text{полн}}$ равна $\Delta G_{\text{AU}} - \Delta G_{\text{петля}}$ в предположении, что стэкинг центральных пар AU—AU разрушается при образовании петли. В табл. 23.5 приведены некоторые параметры и для внутренних петель. Одноцепочечные выступающие вбок петли образуются в таких комплексах, как $A_4U_4 \cdot A_4CU_4$. Анализ этого случая более сложен, поскольку экспериментальных данных для соответствующих комплексов слишком мало. Термодинамические параметры для таких петель были определены из данных по температурной стабильности двухцепочечных полимеров с несовершенной комплементарностью цепей, полученных путем случайной химической модификации и встраивания некомплементарных оснований.

Результаты, приведенные в табл. 23.5, оставляют открытыми два вопроса. Во-первых, хотя различные экспериментальные данные относительно свободной энергии петель согласуются между собой, не ясно, как разделить эти величины на энтальпию и энтропию. Имеющихся данных слишком мало для того, чтобы проверить различные предположения, используемые при их анализе. Согласно этим предположениям, $\Delta H_{\text{петля}}$ может меняться от 0 до больших положительных величин. Таким образом, хотя данные табл. 23.4 и 23.5 и позволяют оценить изменение ΔG^0 (25°C), для встречающихся структур с петлями с их помощью нельзя найти T_m . Второй вопрос состоит в правильном учете больших

Таблица 23.5

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕТЕЛЬ ПРИ 25°C, 1 М Na⁺ 1)

Структура петли (<i>N</i> — число неспаренных оснований)	ΔG^0 , ккал · моль ⁻¹
Шпильки	
Замыкание AU-парой (добавить 1 ккал · моль ⁻¹ , если в петле нет U)	
<i>N</i> = 3	+7
<i>N</i> = 4 — 5	+6
<i>N</i> = 6 — 7	+5
<i>N</i> = 8 — 9	+6
<i>N</i> ≥ 10	7 + 0,9 ln (<i>N</i> /10)
Замыкание GC-парой	
<i>N</i> = 3	+8
<i>N</i> = 4 — 5	+5
<i>N</i> = 6 — 7	+4
<i>N</i> = 8 — 9	+5
<i>N</i> ≥ 10	6 + 0,9 ln (<i>N</i> /10)
Внутренние петли	
	0
<i>N</i> = 2 — 6 (за исключением приведенной выше структуры)	+2
<i>N</i> = 7	+3
<i>N</i> ≥ 8	3 + 0,9 ln (<i>N</i> /7)
Одноцепочечные боковые петли	
<i>N</i> = 1	+3
<i>N</i> = 2 — 3	+4
<i>N</i> = 4 — 7	+5
<i>N</i> ≥ 8	6 + 0,9 ln (<i>N</i> /8)

1) Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr., Physical Chemistry of Nucleic Acids, New York, Harper and Row, 1974.

петель. Этот момент важен для предсказания наиболее стабильных структур молекул РНК, а экспериментальных данных о стабильности таких петель слишком мало.

ВЫЧИСЛЕНИЕ ЭНТРОПИИ НУКЛЕАЦИИ ДЛЯ БОЛЬШИХ ПЕТЕЛЬ

Легко понять, что зависимость свободной энергии образования больших петель от их длины должна быть целиком обусловлена изменениями энтропии. Энтальпия всех взаимодействий, возникающих при инициации или замыкании петли, не должна изменяться, когда петля достигает некоторого определенного размера. Чтобы найти энтропийные изменения, происходящие при образовании петель в двойной спирали или шпильках, рассмотрим структуры, схематически изображенные на рис. 23.8. Замыкание можно рассматривать как процесс перенесения двух концов молекулы одноцепочечной нуклеиновой кислоты внутрь некоторого малого объема V_i . Внутренняя энтропия в расчете на моль це-

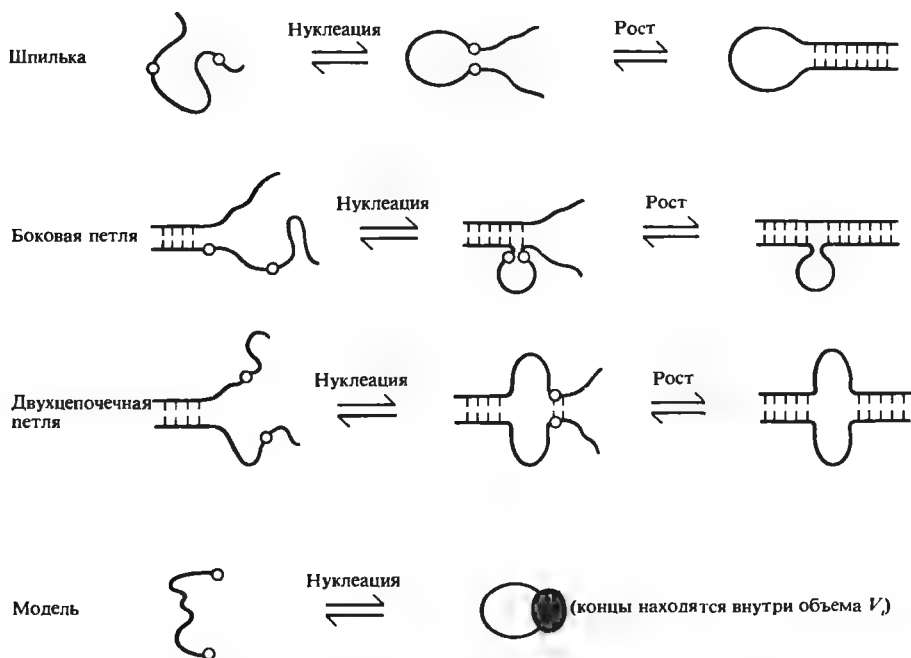


РИС. 23.8. Три типа петель и схематическое изображение образования петли, поясняющее процедуру вычисления изменения свободной энергии на основании конфигурационной статистики линейных цепей.

пей связана с числом возможных конформаций Ω соотношением

$$S = R \ln \Omega \quad (23.37)$$

так что изменение энтропии при замыкании петли равно

$$\Delta S_{\text{петля}} = R \ln(\Omega' / \Omega) \quad (23.38)$$

где Ω' есть число конформаций, которые может принимать цепь с концами, находящимися в объеме V_i .

Самой простой для анализа моделью полимерной цепи является свободно-сочлененная цепь. Нормированная функция распределения расстояния между концами для такой цепи равна (гл. 18)

$$W_N(r) dr = 4\pi r^2 (3/2\pi Nl^2)^{3/2} \exp(-3r^2/2Nl^2) dr \quad (23.39)$$

где N — число мономерных звеньев в цепи, l — длина одного звена. Соотношение (23.39) нельзя непосредственно применять к реальным полинуклеотидам, но его можно использовать для выяснения вида зависимости $\Delta S_{\text{петля}}$ от размера петли.

Доля конфигураций цепи, при которых концы оказываются на расстоянии, меньшем a , равна

$$\Omega' / \Omega = \int_0^a W_N(r) dr \quad (23.40)$$

Если N велико и если нас интересуют лишь малые расстояния между концами, экспонента в выражении (23.39) может быть заменена на единицу. Тогда соотношение (23.40) принимает вид

$$\Omega/\Omega = (3/2\pi N l^2)^{3/2} \int_0^a 4\pi r^2 dr = (3/2\pi N l^2)^{3/2} V_i \quad (23.41)$$

где объем V_i равен просто $4\pi a^3/3$. Из этого выражения следует соотношение Якобсона — Штокмайера для изменения энтропии петли:

$$\Delta S_{\text{петля}} = -(3/2)R \ln N + R \ln[(3/2\pi l^2)^{3/2} V_i] \quad (23.42)$$

Вся зависимость от длины цепи определяется первым членом этого соотношения, второй же член остается постоянным для всех петель. Свободная энергия замыкания больших петель равна просто $-T\Delta S_{\text{петля}}$. Постоянный член в соотношении (23.42) определить довольно трудно ввиду неопределенности объема V_i . Можно, однако, сравнить свободную энергию больших петель с энергией наибольшей из исследованных экспериментально петель. Если длина такой петли равна n , то

$$\Delta G_{\text{петля}}(N) = \Delta G_{\text{петля}}(n) + (3/2)RT \ln(N/n) \quad (23.43)$$

Это выражение учитывает лишь энтропийный вклад в член $\Delta G_{\text{петля}}(n)$ и оставляет открытым вопрос об энтальпийном вкладе. В табл. 23.5 приведены значения $\Delta G_{\text{петля}}$ и параметров уравнения (23.43) для различных типов олигонуклеотидных петель.

Данное рассмотрение энтропии петель является весьма приближенным, поскольку свободно-сочлененная цепь не может считаться достаточно хорошей моделью одноцепочечных полинуклеотидов. Более строгим был бы анализ для условий θ -растворителя (гл. 18), однако эксперименты по плавлению олигонуклеотидов редко выполняются в этих условиях. И все же есть основания считать, что энтропия образования петель в реальных цепях при любых условиях подчиняется соотношению, аналогичному (23.42):

$$\Delta S_{\text{петля}} = -\alpha R \ln N + \text{Const} \quad (23.44)$$

Постоянная α больше $3/2$, и для жестких цепей с исключенным объемом в хорошем растворителе, по-видимому, равна примерно 1,75.

Помня о том, что соотношение (23.43) является приближенным, попытаемся качественно проанализировать с его помощью относительную стабильность различных конфигураций. Рассмотрим равновесие между структурами, изображенными на рис. 23.9. Могут ли в центре большой петли ($N = 20$) образоваться две AU-пары, разбивающие ее на две маленькие петли ($N = 8$)? Исходя из данных табл. 23.4 и 23.5, можно оценить свободную энергию образования двух изображенных на рисунке структур при 25°C .

$$\text{Большая петля: } \Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{\text{петля}}(20) = 3 + 0,9 \ln(20/7) = 3,9 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \quad (23.45)$$

$$\begin{aligned} \text{Маленькие петли: } \Delta G_{\text{полн}} &= \Delta G_{\text{AA}}^0 + 2\Delta G_{\text{петля}}(8) = -1,2 + 2 \cdot [3 + 0,9 \ln(8/7)] = \\ &= 5,0 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \end{aligned} \quad (23.46)$$

Маленькие петли имеют значительно более высокую энергию, так что большую часть времени AU-пары будут находиться в раскрытом состоянии. Отметим, что две GC-пары в центре такой петли могли бы образовывать спираль, поскольку ΔG_{GC} вносит в $\Delta G_{\text{полн}}$ значительно больший отрицательный вклад, чем ΔG_{AA} .

Поучительно рассмотреть аналогичный пример для петель большего размера. Свобод-

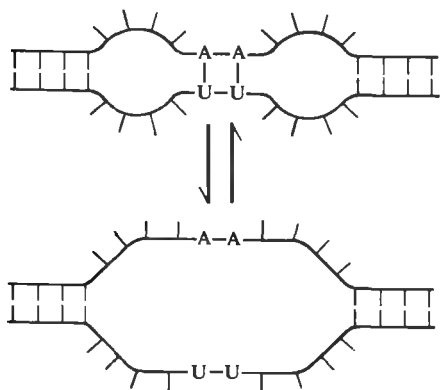


РИС. 23.9. Пример слияния петель. Количественное рассмотрение факторов, определяющих равновесие между двумя формами, приведено в тексте.

ная энергия слияния $\Delta G_{\text{сл}}$ двух петель из N звеньев, разделенных m парами оснований, в одну петлю из $2(N + m)$ звеньев равна

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{сл}} &= \Delta G_{\text{петля}}(2N + 2m) - 2\Delta G_{\text{петля}}(N) - (m - 1)\Delta \bar{G}_{\text{рост}} \\ &= 3 + 0,9 \ln[2(N + m)/7] - 6 - (2 \cdot 0,9) \ln(N/7) - (m - 1)\Delta \bar{G}_{\text{рост}}\end{aligned}\quad (23.47)$$

где $\Delta \bar{G}_{\text{рост}}$ — средняя энергия стэкинг-взаимодействий, значения которой приведены в табл. 23.4, равная примерно $-2,5$ ккал $\cdot$ моль $^{-1}$. Таким образом, если $m \ll N$, то

$$\Delta G_{\text{сл}} \cong -4,9 - 0,9 \ln(N/7) + 2,5m \quad (\text{ккал} \cdot \text{моль}^{-1}) \quad (23.48)$$

По мере увеличения размеров петель в спиральной области между ними должно находиться все больше пар оснований, чтобы эти петли не слились в одну петлю большего размера. При этом свободная энергия петель сравнительно слабо зависит от температуры, поскольку основной вклад в нее вносит энтропия. Напротив, $\Delta \bar{G}_{\text{рост}}$ сильно зависит от температуры и становится очень малой вблизи T_m . Это обстоятельство позволяет понять, почему плавление ДНК является столь кооперативным процессом несмотря на гетерогенность последовательности. Если петли образуются вблизи T_m , с большой вероятностью происходит их слияние.

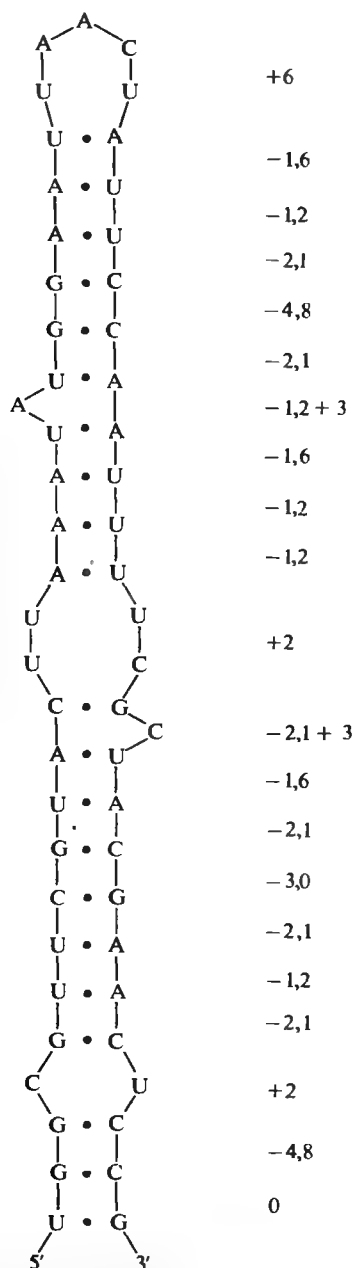
ПРЕДСКАЗАНИЕ СТРУКТУРЫ РНК

Представления, рассмотренные нами в данном разделе, сформировались за последние десять лет. Смысл их состоит в том, что, используя значения параметров, приведенные в табл. 23.4 и 23.5, можно предсказать наиболее стабильные вторичные структуры для молекул РНК с определенными последовательностями. Хотя точность этих предсказаний пока не вполне ясна, в тех случаях, когда результаты удавалось проверить, они оказывались довольно хорошими. Важным является то обстоятельство, что по мере увеличения количества данных для модельных соединений, которые позволяют более четко разграничить вклады отдельных взаимодействий в свободную энергию, точность будет повышаться.

На рис. 23.10 изображена вторичная структура реальной последовательности, полученная расчетным путем. Для произвольной гипотетической вторичной структуры свободная энергия ее образования из одиночных цепей равна

$$\Delta G_{\text{полн}} = \sum \Delta G_{\text{нукл}} + \sum \Delta G_{\text{петля}} + \sum \Delta G_{\text{рост}} \quad (23.49)$$

РИС. 23.10. Определение стабильности модельной вторичной структуры на основании данных, приведенных в табл. 23.4 и 23.5. Последовательность из 55 нуклеотидов соответствует фрагменту РНК вируса R17. Указан вклад в свободную энергию, который дают отдельные петли и межплоскостные взаимодействия. Выигрыш в свободной энергии при образовании приведенной структуры по сравнению с развернутой одиночной цепью составляет $-20,0$ ккал·моль $^{-1}$. По-видимому, для данной последовательности приведенная вторичная структура является наиболее стабильной. (Tinoco I., Jr. et al., *Nature New Biol.*, **246**, 40, 1973.)



где $\Delta G_{\text{рост}}$ — вклад стэкинг-взаимодействий. Следует иметь в виду, что даже такой мощный метод, как этот, позволяет лишь последовательно находить точки на поверхности свободной энергии молекулы. До тех пор пока не проанализированы все возможные структуры, нельзя с уверенностью сказать, что найдена структура с минимальной свободной энергией. Для больших последовательностей такая процедура становится нереальной.

ной, так как она сводится к крайне громоздкой задаче нахождения минимума свободной энергии (задаче, которая уже обсуждалась в этой книге). Следует также иметь в виду, что мы полностью игнорировали роль третичных структур. Реальная структура нуклеиновых кислот соответствует (при условии термодинамического равновесия) минимуму *полной* свободной энергии, а не свободной энергии вторичной структуры. Предсказание структуры основано на предположении, что взаимодействия во вторичной структуре столь сильны, что они существенно сужают круг возможных третичных структур. Справедливо ли это предположение — покажет будущее.

23.2. Кинетика конформационных изменений

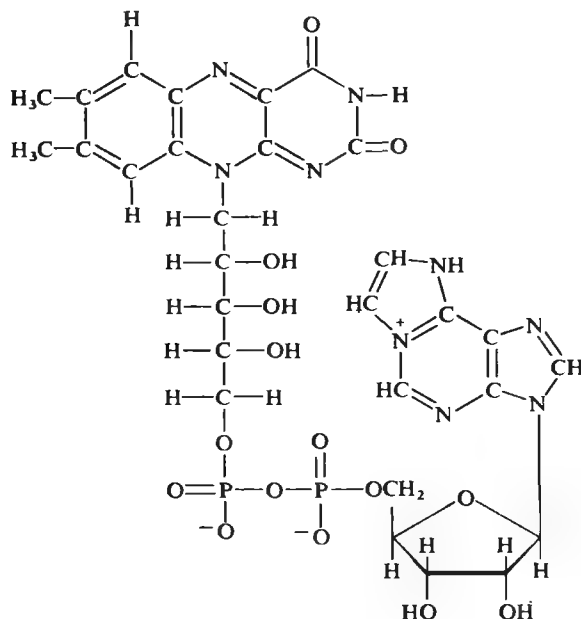
Чтобы выяснить механизм того или иного биохимического процесса, почти всегда необходимо иметь представление о кинетике отдельных его стадий. Репликация и транскрипция ДНК, а также, вероятно, синтез белков и многочисленные процессы регуляции активности генов сопровождаются изменением вторичной структуры. Если бы скорость этих изменений была достаточно велика, биологические системы при своем функционировании могли бы просто выжидать, когда спонтанно возникнет необходимое состояние, и использовать его. В противном случае в биологических системах должны существовать специфические катализаторы (в большинстве случаев белки), которые взаимодействуют непосредственно с участками нуклеиновых кислот, имеющими невозмущенную вторичную структуру, и увеличивают скорость их перехода в нужное состояние. Эти два механизма соответствуют двум совершенно разным требованиям к организмам. Для того чтобы понять основные особенности функционирования нуклеиновых кислот, нужно оценить скорость конформационных перестроек в них.

Мы остановимся здесь на кинетике переходов между одно- и двухцепочечными формами в простых модельных олигонуклеотидных комплексах, а затем покажем, как использовать эту информацию при анализе кинетики денатурации и ренатурации ДНК. Этот анализ послужит основой для выяснения количественных закономерностей гибридизации нуклеиновых кислот, одной из наиболее часто используемых методик в современной молекулярной биологии эукариот.

СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ОСНОВАНИЙ

Кинетические процессы в нуклеиновых кислотах определяются двумя основными видами взаимодействия — стэкингом оснований и их спариванием, т.е. теми же факторами, которые определяют структуру нуклеиновых кислот. Нередко исследование кинетики этих взаимодействий может оказаться полезным для более детального понимания процессов, происходящих в полимерах. Образование стэкинга оснований в олигонуклеотидах является внутримолекулярной реакцией, поэтому его кинетику можно исследовать только путем возмущения системы. В качестве параметра, по которому производится возмущение, естественно выбрать температуру, поскольку ее изменение, как известно, меняет долю оснований, участвующих в стэкинге. Если за время порядка микросекунд поднять температуру раствора олигонуклеотидов, будет наблюдаться разрушение стэкинга, сопровождающееся увеличением поглощения. Однако скорость изменений оказывается слишком большой для количественной регистрации, даже если использовать весьма совершенные методы изучения релаксационных процессов (см., впрочем, работу Dewey, Turner, 1979).

Одним из немногих способов, позволяющих исследовать кинетику образования внутримолекулярного стэкинга оснований, является изучение флуоресценции флавинэтенадениндинуклеотида (FeAD), аналога динуклеотида FAD (флавинадениндинуклеотида), представляющего собой кофермент, в котором одним нуклеозидом является флавиномонону-



A



Б

РИС. 23.11. Кинетика образования стэкинга в динуклеотид-подобном соединении FeAD. А. Структурная формула FeAD. Б. Схематическое изображение состояний, которые необходимо учитывать для объяснения наблюдаемых данных по флуоресценции. В основном состоянии доля оснований, участвующих в стэкинге, составляет 90%. Тушение флуоресценции в этом состоянии происходит практически мгновенно. Скорость перехода из возбужденного состояния без стэкинга в возбужденное состояние со стэкингом достаточно велика, чтобы конкурировать с флуоресценцией. (Barrio J. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 941, 1973.)

клеозид (FMN), а другим — этенаденозин (ϵA). Связь между основаниями в динуклеотиде FAD или в его аналогах отлична от связи в обычных динуклеозидах, и скорость образования стэкинга может не совпадать со скоростью для обычных динуклеотидов (рис. 23.11, А). Однако метод определения этой скорости является весьма поучительным, а результаты позволяют, по крайней мере, судить о том, чего следует ожидать для одноцепочечных нуклеиновых кислот. На рис. 23.11, Б показано, как флуоресцентными методами можно определить скорость образования стэкинга.

Изолированный хромофор ϵA обладает интенсивной флуоресценцией, но в составе $FeAD$ она уменьшается в 10^3 раз из-за синглет-синглетного переноса энергии и не может быть зарегистрирована. Флуоресценция фламина в составе $FeAD$ в 18 раз слабее, чем в составе FMN, но все же достаточно велика для измерения. В невозбужденном состоянии конформация $FeAD$ определяется равновесием между конформациями со стэкингом и без него. Рассмотрим две предельные кинетические модели. Если характерное время образования стэкинга или его разрушения много больше времени жизни возбужденного состояния фламина в димере, то флуоресценция фламина будет описываться суммой двух экспоненциальных членов, соответствующих излучению фламина в упорядоченной и неупорядоченной формах. Для этой последней формы время жизни возбужденного состояния должно быть таким же, как и для FMN. Напротив, если характерное время образования стэкинга много меньше времени жизни возбужденного состояния, для флуоресценции будет наблюдаться лишь одна постоянная времени. Имея в виду, что τ^{-1} (полная скорость распада) является суммой взятых с соответствующими весами скоростей распада для двух указанных форм, можно записать, что

$$\tau^{-1} = \chi_s^* \tau_s^{-1} + (1 - \chi_s^*) \tau_u^{-1} \quad (23.50)$$

где χ_s^* — мольная доля динуклеотидов со стэкингом в возбужденном состоянии, а τ_s и τ_u — времена жизни возбужденного состояния для упорядоченной и неупорядоченной форм соответственно. Можно ожидать, что τ_u будет равно τ_{FMN} , времени жизни возбужденного состояния изолированного FMN, которое составляет 4,7 нс. Для того чтобы эта модель находилась в согласии с наблюдаемой картиной флуоресценции фламина, τ/τ_u должно быть равно F_{FeAD}/F_{FMN} , откуда для τ получаем

$$\tau = \tau_u F_{FeAD}/F_{FMN} = (4,7 \text{ нс}) (1/18) = 0,26 \text{ нс} \quad (23.51)$$

Экспериментальные данные не согласуются ни с одной из этих предельных кинетических моделей. С одной стороны, наблюдается лишь одна постоянная времени, что исключает справедливость первой модели, с другой — это время составляет 2,6 нс, что в десять раз больше той величины, которую дает вторая модель. Таким образом, необходимо рассмотреть более адекватную кинетическую схему. Единственный простой путь, позволяющий разрешить это противоречие, состоит в том, чтобы постулировать очень быстрое тушение флуоресценции при наличии стэкинга; тогда наблюдаемая флуоресценция будет целиком обусловлена неупорядоченной формой. При этом, однако, скорость образования стэкинга оказывается достаточно большой, чтобы вызвать частичное тушение возбужденных состояний неупорядоченной формы (рис. 23.11), иначе постоянные времени для $FeAD$ и FMN должны были бы быть одинаковыми. Пусть k_s^* — константа скорости первого порядка для образования стэкинга в $FeAD$, находящемся в возбужденном состоянии; тогда

$$1/\tau_{FeAD} = k_s^* + k_F + k_e \quad (23.52a)$$

$$1/\tau_{FMN} = k_F + k_e \quad (23.52b)$$

где k_F — константа скорости флуоресценции, а k_c равна сумме констант скоростей всех безызлучательных переходов. Таким образом, константа k_s^* определяется соотношением

$$k_s^* = \tau_{FeAD}^{-1} - \tau_{FMN}^{-1} \quad (23.52b)$$

и равна $1,7 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$.

Из данных по флуоресценции можно определить также константу равновесия для образования стэкинга. Согласно принятой нами схеме, флуоресценция целиком обусловлена неупорядоченной формой. Если бы эта форма была единственной присутствующей, отношение F_{FeAD}/F_{FMN} было бы равно τ_{FeAD}/τ_{FMN} . Поскольку в некоторых молекулах FeAD стэкинг существовал и до возбуждения, стационарная флуоресценция оказывается ниже:

$$F_{FeAD}/F_{FMN} = (1 - \chi_s)\tau_{FeAD}/\tau_{FMN} \quad (23.53)$$

Из соотношения (23.53) можно определить мольную долю динуклеотидов со стэкингом χ_s и затем найти константу равновесия для образования стэкинга в основном состоянии, $K_s = \chi_s/(1 - \chi_s) = 9$. Если бы константы скоростей для образования стэкинга в основном и возбужденном состояниях совпадали, то константа скорости разрушения стэкинга была бы равна $k_{-s} = k_s^*/K_s = 1,9 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$. Тогда время релаксации, которое получалось бы в результате исследований методом температурного скачка или каким-либо аналогичным методом (гл. 16), составило бы $\tau = (k_s^* + k_{-s})^{-1} = 5,3 \text{ нс}$. Это значительно меньше тех значений, которые обычно наблюдаются в релаксационных экспериментах. Следовательно, мы вполне можем пренебречь временем образования одноцепочечного стэкинга при анализе кинетики других конформационных изменений в нуклеиновых кислотах. Лимитирующие процессы или релаксационные процессы, наблюдаемые в двухцепочечных системах, должны соответствовать другим элементарным актам.

СПАРИВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОСНОВАНИЙ

В качестве модели кинетики спаривания оснований можно рассмотреть релаксацию комплексов изолированных оснований или их производных, связанных водородными связями. Такие комплексы слишком нестабильны, чтобы можно было исследовать их водные растворы, и приходится использовать неводные растворители. Изменение доли спаренных оснований можно индуцировать, поместив образец в сильное электрическое поле ($\sim 200\,000 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$) и наложив высокочастотное модулирующее поле. Поскольку спаривание оснований приводит к изменению дипольного момента, при изменении поля равновесие этого процесса смещается. Релаксацию можно исследовать с помощью таких методов, как метод дисперсии диэлектрической проницаемости (гл. 12). Процесс можно представить в виде схемы



а время релаксации равно (гл. 16)

$$\tau^{-1} = k_1(\bar{A} + \bar{B}) + k_{-1} \quad (23.54b)$$

где черточки над буквами указывают, что имеются в виду равновесные концентрации. Поэтому константы скорости как прямой, так и обратной реакции можно определить, измерив концентрационную зависимость времени релаксации процесса.

Результаты таких опытов показывают, что $k_1 > 10^9 \text{ с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Это столь большая константа, что процесс должен лимитироваться диффузией, т.е. временем, которое необ-

ходимо для случайного столкновения оснований в растворе. Для всех пар оснований константы скорости образования примерно одинаковы. Скорости диссоциации зависят от стабильности комплекса; при этом наименее стабильные комплексы имеют, естественно, самые большие константы скорости диссоциации. Так или иначе, скорости диссоциации также очень велики и лежат в интервале от 10^6 до 10^8 с^{-1} . Таким образом, наиболее важные взаимодействия в нуклеиновых кислотах характеризуются очень малыми временами релаксации. Конечно, скорость столкновения пар уменьшается при очень низких концентрациях, как и должно быть для любого бимолекулярного кинетического процесса. При концентрации 10^{-6} М скорость образования пар оснований составляет всего 10^3 с^{-1} . Это достаточно низкая скорость, и она может оказаться существенным фактором при кинетических исследованиях разбавленных растворов олигонуклеотидов или нуклеиновых кислот.

ОБРАЗОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Рассмотрим кинетику плавления самокомплементарных или комплементарных олигонуклеотидных двойных спиралей. Для простоты будем считать, что с заметной вероятностью могут существовать только состояния с одним непрерывным спиральным участком, что цепи не смещены друг относительно друга и что имеется лишь один центр нуклеации. На рис. 23.12 схематически изображена наиболее общая модель, удовлетворяющая таким условиям. В ней учитывается, что константы скоростей прямой и обратной реакции, соответствующие образованию последовательных пар оснований, могут отличаться друг от друга. Для системы, состоящей из n пар оснований, в рамках такой модели должна существовать $(n - 1)$ постоянная времени релаксации.

Экспериментальный анализ кинетики таких систем оказывается очень сложным уже для $n > 4$. Однако изучение термодинамики плавления олигомеров (рассмотренное ранее) показывает, что для описания плавления достаточно более простой модели. Вполне допустимым является приближение, в котором концентрации промежуточных состояний ($H_1, H_2, \dots, H_{n-1}$) считаются стационарными, а меняются лишь концентрации конечных состояний C и H_n (рис. 23.12). Такое приближение часто используется для анализа конформационных изменений (гл. 21). Однако для рассматриваемого процесса результаты даже такого приближения оказываются весьма сложными. Поэтому мы обратимся к еще более простой модели двух состояний, достаточной для объяснения большинства кинетических данных.

Модель двух состояний использовалась нами ранее при рассмотрении статистической термодинамики плавления олигомеров. При анализе кинетики мы будем считать, что су-

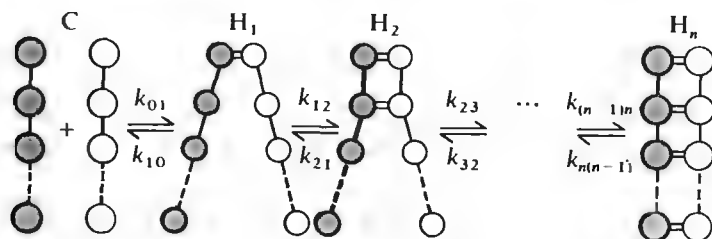


РИС. 23.12. Кинетическая модель образования олигонуклеотидной двойной спирали. Предполагается, что цепи не смещены друг относительно друга и имеется лишь один центр нуклеации. В общем случае все указанные константы скоростей различаются.

ществены только начальное и конечное состояния системы, и поэтому все измеряемые оптические характеристики относятся просто к реакции плавления самокомплементарных олигонуклеотидов:



Время релаксации для этой реакции определяется соотношением (гл. 16)

$$1/\tau = 4k_1 \bar{C} + k_{-1} \quad (23.556)$$

В случае комплементарных олигомерных пар регистрируемая реакция описывается уравнением



которому отвечает время релаксации

$$1/\tau = k_1(\bar{C}_A + \bar{C}_B) + k_{-1} \quad (23.566)$$

Используя это предельное упрощение, нужно ясно понимать, что смысл получаемых при этом констант скоростей до конца не определен, даже если экспериментальные данные хорошо описываются данной моделью. Детальный физический смысл константы k_1 будет рассмотрен ниже.

Многие олигомерные системы были исследованы с помощью метода температурного скачка. Как правило, в этих системах наблюдалось лишь одно время релаксации, и экспериментальные данные хорошо описывались соотношениями (23.556) или (23.566), несмотря на их приближенный характер. Однако простая интерпретация этих данных была невозможна: k_1 нельзя было считать константой скорости для столкновения двух изолированных одиночных цепей. К этому выводу приводит анализ данных табл. 23.6, в част-

Таблица 23.6

КИНЕТИКА РЕЛАКСАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (21 — 23°C)¹⁾

Комплекс	$k_1, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$E_a,$ ккал · моль ⁻¹	$\nu^2)$	k_{-1}, c^{-1}	$E_a,$ ккал · моль ⁻¹
$A_9 \cdot U_9$	$5,3 \cdot 10^5$	-8	3	640	30
$A_{10} \cdot U_{10}$	$6,2 \cdot 10^5$	-14	3	175	45
$A_{11} \cdot U_{11}$	$5,0 \cdot 10^5$	-12	3	28	53
$A_{14} \cdot U_{14}$	$7,2 \cdot 10^5$	-17,5	3	1	75
$A_4U_4 \cdot A_4U_4$	$1,0 \cdot 10^6$	-6	2-3	3000	37
$A_5U_5 \cdot A_5U_5$	$1,8 \cdot 10^6$	-4	2-3	150	50
$A_6U_6 \cdot A_6U_6$	$1,5 \cdot 10^6$	-3	2-3	8	60
$A_7U_7 \cdot A_7U_7$	$8,0 \cdot 10^5$	+5	2-3	0,8	65
$A_2GCU_2 \cdot A_2GCU_2$	$1,6 \cdot 10^6$	+3	1-2	450	33
$A_3GCU_3 \cdot A_3GCU_3$	$7,5 \cdot 10^5$	+7	1-2	3	50
$A_4GCU_4 \cdot A_4GCU_4$	$1,3 \cdot 10^5$	+8	1-2	1,5	26
$A_5G_2 \cdot C_2U_5$	$4,4 \cdot 10^6$	+7	1-2	340	43
$A_4G_3 \cdot C_3U_4$	$4,2 \cdot 10^6$	+9	1-2	5	44

¹⁾ Riesner D., Römer R. In: Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids, vol. 2, ed. J. Duchesne, London, Academic Press, 1973.

²⁾ Параметр ν — это длина спирального участка, образование которого является лимитирующей стадией.

ности следующие два фактора. Константы скорости имеют порядок величин $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; это значительно меньшие скорости, чем те, которые отвечают спариванию оснований в мономерных комплексах, и эти скорости слишком малы, чтобы соответствовать лимитируемому диффузией столкновению цепей. Еще более убедительным фактором является температурная зависимость константы скорости k_1 . Для широкого набора систем эта зависимость описывается уравнением Аррениуса

$$d(\ln k_1)/d(1/T) = -E_a/R \quad (23.57)$$

где E_a — кажущаяся энергия активации. Однако получающиеся константы скорости уменьшаются с увеличением температуры для олигомеров, не содержащих GC-пар (рис. 23.13). Поэтому кажущаяся энергия активации является отрицательной величиной, изменяющейся от -4 до -9 ккал $\cdot$ моль $^{-1}$. Энергия активации для процесса с константой скорости k_{-1} оказывается большой положительной величиной. Это вполне понятно, поскольку пары оснований должны быть разрушены при любом способе разделения цепей спирали.

● АНАЛИЗ КИНЕТИКИ СПАРИВАНИЯ ОСНОВАНИЙ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДАХ

Элементарный акт любого процесса не может характеризоваться отрицательной энергией активации. Поэтому k_1 (а следовательно, и k_{-1}) должна представлять собой комбинацию констант скорости отдельных элементарных актов. В простейшей модели, в рамках которой удастся объяснить этот факт, предполагается установление быстрого предравновесия для процесса образования короткой спиральной области, содержащей ν пар оснований. Увеличение длины спирального участка от ν до $\nu + 1$ рассматривается как акт, лимитирующий скорость всего процесса. При анализе равновесного плавления мы определили κ как константу равновесия для образования первой пары оснований в комплексе, а константы присоединения каждой последующей пары считали равными s . Нетрудно видеть, однако, что это простое предположение плохо согласуется с кинетическими данными.

Образование первой пары оснований не может быть лимитирующим актом из-за отрицательной энергии активации. Таким актом могло бы быть образование второй пары. В

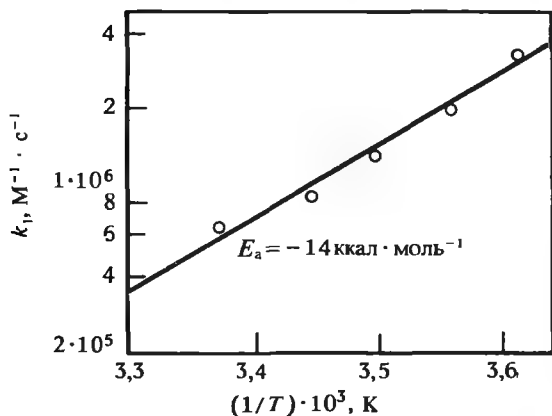


РИС. 23.13. Зависимость суммарной константы скорости k_1 образования комплекса от температуры, приведенная в аррениусовых координатах. Положительный наклон прямой означает, что кажущаяся энергия активации процесса отрицательна. (D. Pörshke, неопубликованные данные.)

этом случае для образования первой пары должно быстро устанавливаться равновесие и наблюдаемая константа скорости прямой реакции должна быть равна¹

$$k_1 = (k_{01}/k_{10})k_{12} = \kappa k_{12} \quad (23.58a)$$

а энергия активации —

$$d(\ln k_1)/d(1/T) = d(\ln \kappa)/d(1/T) + d(\ln k_{12})/d(1/T) = \Delta H_{\text{нукл}} + E_{a,k_{12}} \quad (23.58b)$$

где $\Delta H_{\text{нукл}}$ — энтальпия образования первой пары, а $E_{a,k_{12}}$ — энергия активации для образования второй пары. Как указывалось выше, энтальпия образования зародыша спирали не превышает небольшой отрицательной величины. Энергия активации для процесса с константой скорости k_{12} не может быть меньше нуля и скорее всего есть небольшая положительная величина, как это имеет место для большинства элементарных реакций. Поэтому кинетическая схема, которой соответствует соотношение (23.58a), не может объяснить большой отрицательной энергии активации, наблюдаемой на опыте для процесса с константой скорости k_1 .

Следующим этапом в нашем рассмотрении является введение предположения о том, что скорость реакции лимитируется образованием третьей пары оснований. Это означает, что имеет место быстрое установление равновесия для процесса образования состояния с двумя парами оснований, и, следовательно,

$$k_1 = (k_{01}/k_{10})(k_{12}/k_{21})k_{23} = \kappa s k_{23} \quad (23.58b)$$

В этом случае энергия активации равна $\Delta H_{\text{нукл}} + \Delta H_{\text{рост}} + E_{a,k_2}$. Поскольку $\Delta H_{\text{рост}}$ является большой отрицательной величиной, соотношение (23.58b) может объяснить наблюдаемую отрицательную энергию активации. Однако это соотношение противоречит модели двух состояний, использованной для описания термодинамического равновесия.

Если каждый следующий после образования зародыша спирали шаг характеризуется одной и той же константой равновесия s , значение которой, как следует из измерений свободной энергии стэкинга, очень велико, то

$$s = k_{12}/k_{21} = k_{23}/k_{32} \gg 1 \quad (23.59)$$

Если, далее, все пары оснований, кроме первой, эквивалентны, то должны выполняться условия $k_{12} = k_{23} = k_{34} = \dots$, и поэтому $k_{23} \gg k_{21}$, $k_{34} \gg k_{32}$ и т.д. Но это означает, что состояние с двумя или тремя парами оснований не может быть лимитирующим, поскольку оно должно быстро переходить в состояния с большим числом пар. Это противоречие можно обойти, если предположить, что имеются разные параметры нуклеации, κ_1 и κ_2 , по крайней мере для двух первых пар. В этом случае

$$k_1 = \kappa_1 \kappa_2 k_{23} \quad (23.60)$$

Это означает, что параметр нуклеации, соответствующий равновесному плавлению, равен $\kappa_1 \kappa_2 / s$. Этот пример служит иллюстрацией того общего факта, что кинетические ис-

¹ Более строгое рассмотрение дает $k_1 = \kappa k_{12} (1 - k_{21}/k_{12})$. Наличие дополнительного множителя обеспечивает равенство нулю константы скорости прямой реакции при $T = T_m$. См. работу Crothers D. M., Davidson N., Kallenbach N. R., J. Am. Chem. Soc., 90, 3560, 1968.

следования могут дать дополнительную информацию о промежуточных этапах процесса, которые не выявляются при равновесных исследованиях.

Для олигомеров, содержащих GC-пары, энергия активации, соответствующая релаксации в бимолекулярной реакции, оказывается положительной. Поэтому в данном случае у нас имеется меньше ограничений на механизм образования зародыща двойной спирали. Однако, как показывает детальное рассмотрение, имеющиеся данные трудно совместить с предположением о том, что лимитирующим является образование первой пары. Более вероятным на основании анализа значений констант скоростей и энергий активации представляется такой механизм, при котором быстро устанавливается предравновесие для процесса образования первой пары и лимитирующим является образование второй пары. Уместно, однако, задаться вопросом, где нам следует остановиться. Почему не предположить, что лимитирующим является образование четвертой, пятой или любой другой пары оснований? Здесь нам помогает знание энергии активации, поскольку, чем более протяженной является область предравновесия, тем больше отрицательная по величине общая энергия активации E_a . Если бы мы предположили, что для олигомеров, содержащих AU-пары, лимитирующей стадией является образование четвертой пары, мы получили бы слишком большое отрицательное значение энергии активации, которое трудно было бы согласовать с имеющимися термодинамическими данными.

Выражения для k_1 и k_{-1} в общем виде для случая, когда в образовании зародыща спирали участвует несколько пар, были получены в работе Крэйг и др. (Craig M. E. et al., 1971). Мы не будем здесь воспроизводить их результаты, но отметим один общий вывод: в модели двух состояний скорость прямой реакции для гомологичного ряда олигомеров должна линейно расти с увеличением длины. Имеющиеся экспериментальные данные плохо согласуются с этим выводом, хотя во многих работах точность была недостаточной для его проверки. Не следует удивляться, если в будущем окажется, что модель двух состояний плохо описывает реальное поведение олигонуклеотидов.

Получаемые на опыте скорости и энергии активации для образования спирали (табл. 23.6) в основном не зависят от длины цепи. Напротив, скорость разрушения спиральной структуры очень резко падает с увеличением длины для большинства исследованных систем. Энергия активации для плавления также сильно зависит от длины цепи и составляет 5-6 ккал на каждую пару почти для всех приведенных в табл. 23.6 комплексов. Эта величина лишь немного меньше известной энтальпии разрушения стэкинга пары оснований. Таким образом, можно сделать вывод, что лимитирующим этапом при диссоциации коротких спиральных комплексов является разрушение большей части пар оснований, которое необходимо, по-видимому, для образования быстро релаксирующего состояния, содержащего лишь зародыш спиральной структуры и играющего важную роль при образовании спирали. В опытах по релаксационной кинетике олигонуклеотидов, как правило, используются концентрации цепей около 10^{-6} М. Поэтому, как следует из соотношений (23.556) и (23.566) и табл. 23.6, при комнатной температуре процесс лимитируется диссоциацией цепей. При этом наблюдаемые времена релаксации лежат в интервале от 1 мс до 1 с.

ОБРАЗОВАНИЕ ШПИЛЕК

Интересно сравнить предыдущие результаты с данными, получающимися при исследовании внутримолекулярной кинетики образования шпилек. Времена релаксации этого процесса не зависят от концентрации цепей. Если реакцию представить как



где S — неупорядоченные цепи, а H — шпильки, то время релаксации будет определяться

соотношением

$$1/\tau = k_1 + k_{-1} \quad (23.616)$$

Оказалось, что для различных шпилек времена релаксации вблизи T_m имеют порядок 10^{-5} с. Это приблизительно на два порядка меньше, чем время релаксации в системе комплементарных одиночных цепей. Нетрудно видеть из уравнения (23.616), что определить обе константы скорости, k_1 и k_{-1} , лишь на основании кинетических данных невозможно. Еще одно уравнение можно записать, если известна константа равновесия, равная k_1/k_{-1} . Из этих данных можно найти обе константы скорости. Однако ситуация становится особенно простой при $T = T_m$, когда $k_1 = k_{-1}$ и релаксационные измерения позволяют найти сразу обе константы скорости.

Для шпильки $A_4GC_5U_5$ эти измерения дают $k_1 = k_{-1} = 5 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ при $T = T_m$. Сходные величины были получены и для нескольких шпилек, вырезанных из природных тРНК. Попытаемся понять эти результаты, опираясь на данные, полученные для линейных комплексов. Поскольку спиральный участок в типичной шпильке значительно короче, чем в большинстве исследованных модельных двухцепочечных комплексов, большая скорость диссоциации непосредственно следует из экстраполяции той закономерности, которая видна из табл. 23.6. Скорость образования спиральной части шпильки можно оценить, приняв, что лимитирующая стадия при образовании шпилек и межмолекулярных комплексов одна и та же. Не останавливаясь подробно на энергетике изгибания остова в петле, можно предположить быстрое установление предравновесия между структурой, не имеющей спаренных оснований, и структурой с зародышем спирали, предшествующее лимитирующему этапу. Грубая оценка показывает, что концентрация одного из концов олигомера вблизи другого конца равна по порядку величины 0,1 М. Поэтому для константы скорости этого внутримолекулярного процесса получаем оценку $0,1 k_1 \text{ с}^{-1}$, где k_1 — константа скорости второго порядка для межмолекулярной реакции образования спирали. Используя величины, приведенные в табл. 23.6, получаем для внутримолекулярной константы скорости k_1 значение $10^4 - 10^5 \text{ с}^{-1}$, которое оказывается в том же диапазоне, что и наблюдаемые величины. Таким образом, хотя оба процесса характеризуются одними и теми же основными кинетическими стадиями, нет ничего удивительного в том, что скорость релаксации для внутримолекулярного процесса намного больше, чем для межмолекулярного.

ПЛАВЛЕНИЕ ДНК

Термодинамика плавления природных ДНК значительно сложнее термодинамики плавления модельных олигонуклеотидов, поэтому кинетика денатурации и ренатурации ДНК также должна быть более сложной. Действительно, некоторые аспекты этого процесса до сих пор не вполне понятны, хотя в течение пятнадцати последних лет в этой области ведутся интенсивные исследования. Представление об основных трудностях, которые встречаются при анализе этого процесса, дает рис. 23.14. В случае коротких олигомеров для описания большинства наблюдаемых результатов достаточно учесть лишь нуклеацию и рост спиральной области. При анализе денатурации ДНК следует принять во внимание образование и слияние петель, происходящее из-за крупномасштабной гетерогенности по нуклеотидному составу. Плавление коротких олигомеров полностью обратимо, чего нельзя сказать о модельных полинуклеотидах. Изменение их оптических свойств при плавлении действительно обратимо, для гидродинамических же свойств наблюдается гистерезис, (гл. 22)

Для большинства реальных ДНК ситуация оказывается еще более сложной: заметный гистерезис наблюдается и для изменения их оптических свойств (рис. 23.15). Этот гисте-

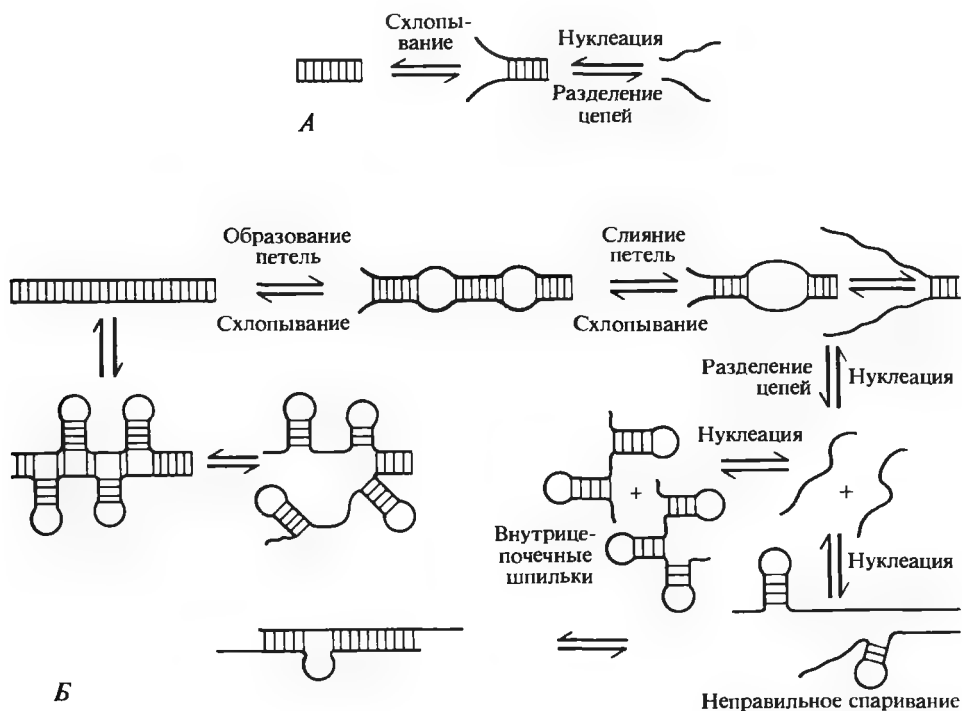


РИС. 23.14. Состояния, которые должны быть рассмотрены при анализе денатурации и ренатурации. А. Короткие полинуклеотидные спирали. Б. Природная двухцепочечная ДНК.

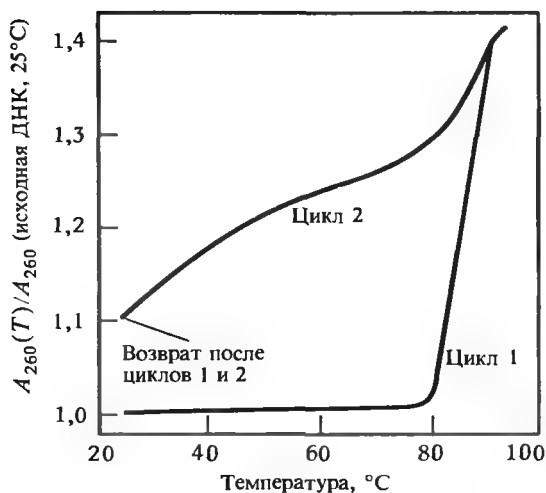


РИС. 23.15. Гистерезис при плавлении ДНК тимуса телянка в 0,15 M NaCl, pH 7. При первом цикле нагревания наблюдается резкий температурный переход. Быстрое охлаждение препарата не приводит к восстановлению исходного поглощения. Новый низкотемпературный уровень поглощения сохраняется и при последующих циклах, при условии, что скорость охлаждения не меняется. Уширение кривой повторного плавления указывает на присутствие в ДНК, подвергавшейся денатурации, большого числа разных участков с несовершенным спариванием. (Steiner R. F., Beers R. F., Polynucleotides, New York, American Elsevier, 1961.)

резис обусловлен кинетическими эффектами при ренатурации; происхождение некоторых из них указано на рис. 23.14. Когда раствор ДНК с полностью разошедшимися цепями охлаждают ниже T_m , начинается реассоциация цепей. Этот процесс идет медленно, поскольку он представляет собой реакцию второго порядка, а концентрация отдельных цепей для раствора высокомолекулярной ДНК очень мала. Кроме того, имеется конкурирующий процесс образования внутримолекулярных шпильек. Эти шпильки термодинамически менее стабильны, чем нативная двойная спираль, но скорость внутримолекулярных процессов при низкой концентрации цепей значительно выше скорости образования межмолекулярных зародышей спирали. Образование внутримолекулярных шпильек ведет к значительному уменьшению размеров одноцепочечного клубка, и взаимное проникновение двух таких плотных клубков может оказаться в значительной мере затруднено. Таким образом, хотя две разошедшиеся цепи могут образовать зародыш спиральной области, который постепенно будет разрастаться и из которого в конце концов образуется нативная структура, скорость ренатурации может быть чрезвычайно малой.

Степень ренатурации, которая наблюдается на опыте, зависит от экспериментальных условий и от природы ДНК. Если резко понизить температуру раствора от значения, лежащего значительно выше T_m , до значения, лежащего намного ниже T_m , вероятность того, что разошедшиеся комплементарные цепи найдут друг друга, будет очень мала. Внутрицепочечная вторичная структура, сформировавшаяся при охлаждении, будет очень стабильна, и восстановление нативной структуры окажется полностью заблокированным. Такую ДНК обычно называют денатурированной, хотя считать ее одноцепочечной, как это часто делают, нельзя. В ней имеются двухцепочечные области, которые препятствуют ренатурации. Если вместо быстрого охлаждения производить медленный отжиг ДНК, постепенно понижая температуру раствора или в течение длительного времени поддерживая ее на одном уровне вблизи T_m , то, хотя внутрицепочечные шпильки и будут образовываться, они будут не очень стабильны. Со временем сформируются правильные зародыши двухцепочечной формы, и по мере дальнейшего понижения температуры будет происходить их разрастание вплоть до образования нативной структуры.

Возможны, однако, дополнительные осложнения (рис. 23.14). Предположим, что в ДНК имеются повторяющиеся последовательности — обычное явление для большинства геномов эукариот. В этом случае при температуре, близкой к T_m , могут образовываться зародыши спиральных областей, по стабильности не отличающиеся от правильных, но со сдвигом цепей друг относительно друга. При дальнейшем охлаждении будет образовываться комплекс, содержащий одноцепочечные петли и концы. Конечно, такая структура должна в конце концов перейти в нативную форму, но если длина повторяющейся области достаточно велика, энергия активации для разрушения неправильной структуры окажется слишком большой, чтобы ренатурация могла завершиться в обозримое время.

Из всего сказанного ясно, что полное описание релаксационной кинетики плавления ДНК является исключительно трудной задачей. Мы здесь не будем пытаться решить ее, и вместо этого сосредоточим внимание на двух аспектах кинетики плавления ДНК: кинетике разрушения спирали до разделения цепей и кинетике образования зародышей спиральных областей (т.е. начала рекомбинации) при температурах, лежащих немного ниже T_m . Каждый из этих вопросов в соответствующих предельных случаях представляется достаточно простым.

ПЛАВЛЕНИЕ ДНК ДО РАЗДЕЛЕНИЯ ЦЕПЕЙ

Прежде всего нужно найти критерий, который позволил бы нам судить о том, произошло или нет разделение цепей в данном образце. Однозначный ответ на этот вопрос могли бы дать гидродинамические методы, но проще прибегнуть к измерению поглощения, основываясь на кинетических закономерностях, рассмотренных выше. Если раствор двух-

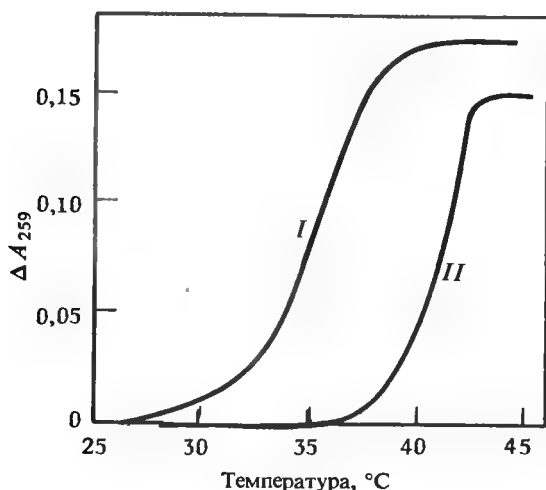


РИС. 23.16. Исследование разделения цепей при плавлении ДНК фага T2 в 7,2 М NaClO₄ с помощью регистрации поглощения. Кривая I — увеличение поглощения при нагревании ДНК до указанной температуры. Кривая II — необратимая потеря гиперхромизма при нагревании ДНК от 25°C до указанной температуры и последующем быстром охлаждении до 25°C. (Geiduschek E. P., J. Mol. Biol., 4, 467, 1962.)

щепочной ДНК нагреть до температуры, лежащей вблизи T_m , то цепи не разойдутся, поскольку некоторые GC-богатые участки в молекуле останутся нерасплавленными. Поэтому при последующем быстром охлаждении произойдет быстрое восстановление спиральной структуры в расплавленных участках, и поглощение раствора станет прежним. Инкубация при более высоких температурах вызовет разрушение этих последних двухщепочных участков и цепи смогут разойтись. В этом случае быстрое охлаждение не приведет к восстановлению поглощения.

Такое «необратимое плавление» обычно начинается лишь после того, как обратимое плавление пройдет на три четверти (рис. 23.16). Оно может служить хорошим простым критерием разделения цепей. В принципе разделение цепей не должно происходить вплоть до температур, соответствующих выходу поглощения на плато. Для того чтобы удерживать цепи вместе, достаточно одного короткого спирального участка с повышенной стабильностью, который дает незначительный вклад в поглощение. Однако большинство препаратов ДНК содержат однощепочные разрывы. Эти разрывы приводят к артефактам, такие ДНК кажутся состоящими по крайней мере из нескольких разных двухщепочных молекул. Из-за наличия разрывов из комплекса во время плавления постепенно освобождаются протяженные сегменты. Это явление объясняет, по-видимому, наблюдаемую ширину кривой необратимого плавления.

Приведенные на рис. 23.16 данные говорят о том, что расплетание двойной спирали нужно исследовать методом температурного скачка, при котором образец переводился бы в условия, соответствующие степени денатурации не более чем 75%. Если бы такое исследование проводилось для олигомерных комплексов, цепи которых не могут разойтись (естественной моделью такой системы являются шпильки), оно бы показало, что время релаксации не зависит от концентрации цепей. Для нативной ДНК, однако, кинетика расплетания оказывается удивительно сложной (рис. 23.17). Прежде всего обращает на себя внимание малая скорость расплетания. Для плавления внутримолекулярных шпилек вблизи T_m времена релаксации составляют около 10^{-5} с, а для ДНК, хотя данные и не описываются одним временем релаксации, характерные времена процесса расплетания составляют 10^2 — 10^3 с. Можно грубо оценить время плавления ДНК, основываясь на данных для модельных олигомеров. Предположим, что лимитирующей стадией является расплетание, и будем считать, что оно начинается от одной-единственной петли. Это даст нам максимальное возможное время плавления ДНК, поскольку в действительности,

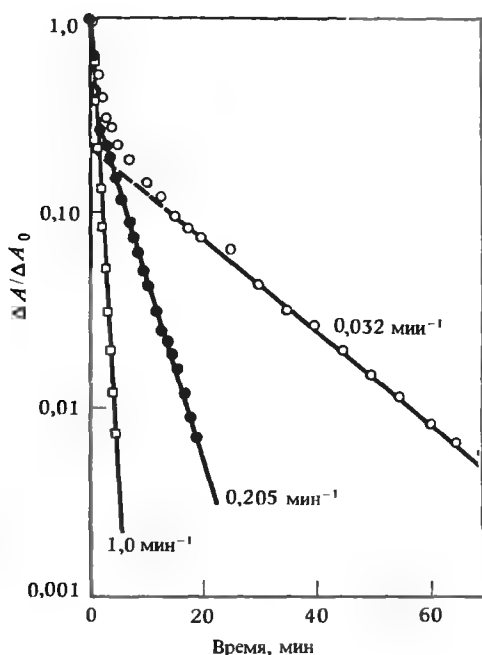


РИС. 23.17. Кинетика денатурации ДНК фага T2 в 0,08 М Na⁺, 80%-ном формамиде. Три образца были нагреты до разных температур, соответствующих степени денатурации 25% (□), 53% (●) и 95% (○). (Record M. T., Zimm B. H., Biopolymers, 11, 1435, 1972.)

как известно, в начале процесса образуется более одной петли. Высокомолекулярная вирусная ДНК, например ДНК фага T2, содержит $2 \cdot 10^5$ пар оснований. Если разрастание исходной петли до размеров всей ДНК происходит необратимо со скоростью, характерной для олигомеров, т.е. 10^{-5} с на пять пар оснований, то плавление всей ДНК должно занять только 10^{-1} с. При учете множественной нуклеации расплавленных областей мы бы получили на один-два порядка меньшее время. Таким образом, нам нужно объяснить расхождение на три-пять порядков между предсказанным и наблюдаемым временем релаксации.

М. Рекорд и Б. Зимм (M. Record, B. Zimm, 1972) пришли к заключению, что сложность наблюдаемого кинетического процесса (рис. 23.17) является следствием изменения во времени параметра, определяющего скорость расплетания. Поэтому не имеет смысла разлагать наблюдаемые кинетические кривые на произвольное число экспонент. Параметр, определяющий скорость процесса, имеет следующие свойства. Он становится постоянным, равным k_{∞} , при больших временах. При этом процесс образования новых расплавленных участков уже завершен, и происходит только разрастание ранее образовавшихся участков. Константа скорости k_{∞} приблизительно в 20 раз меньше, чем начальная скорость. Она значительно меньше для температурных скачков, приводящих к полной денатурации, чем для небольших температурных возмущений, приводящих к денатурации лишь на 25-50%. Далее, для фиксированной конечной степени расплетания величина k_{∞} обратно пропорциональна молекулярной массе ДНК. Эти факты очень важны, поскольку они означают, что скорость расплетания пары оснований по какой-то причине сильно зависит от длины ДНК и от того, в каком состоянии находятся другие участки ДНК — в спиральном или клубкообразном.

ВЛИЯНИЕ ТРЕНИЯ НА ПЛАВЛЕНИЕ ДНК

Ключ к пониманию всех этих удивительных особенностей кинетики дают физические процессы, которые происходят при денатурации ДНК. Большая часть зародышей денатурированных областей образуется в середине молекулы ДНК, поскольку вероятность расположения АТ-обогащенных участков именно на концах цепей мала. Для роста зародышей необходимо раскрытие пар оснований. Поскольку ДНК является двойной спиралью, раскрытие может происходить, только если один конец растущей петли вращается относительно другого (рис. 23.18). Такое вращение, сопровождающее расплетание, должно происходить вокруг оси спирали. В начальные моменты времени (или при малых степенях денатурации) вращение осуществляется сравнительно легко. Этот процесс зависит от выигрыша свободной энергии ΔG при выплвлении пары. Ему препятствует трение, но оно довольно мало для длинной палочки, вращающейся вокруг своей продольной оси. По оценкам, начальная скорость вращения достигает 10^4 оборотов в минуту. Однако по мере плавления вместо довольно обтекаемой спирали появляются объемистые клубкообразные области. Трение при вращении этих областей значительно больше и скорость расплечения ДНК уменьшается. Увеличение трения приводит к тому, что раскручивание цепей становится лимитирующей стадией для оставшейся части процесса плавления. В результате скорость денатурации падает, приближаясь к конечному значению k_∞ , которое соответствует плавлению последней небольшой доли пар оснований. Уменьшение k_∞ при увеличении конечной степени денатурации можно объяснить тем, что при этом возникает все больше клубкообразных областей большего размера. Те же соображения объясняют и заметное уменьшение k_∞ при увеличении молекулярной массы. Одним из доказательств,

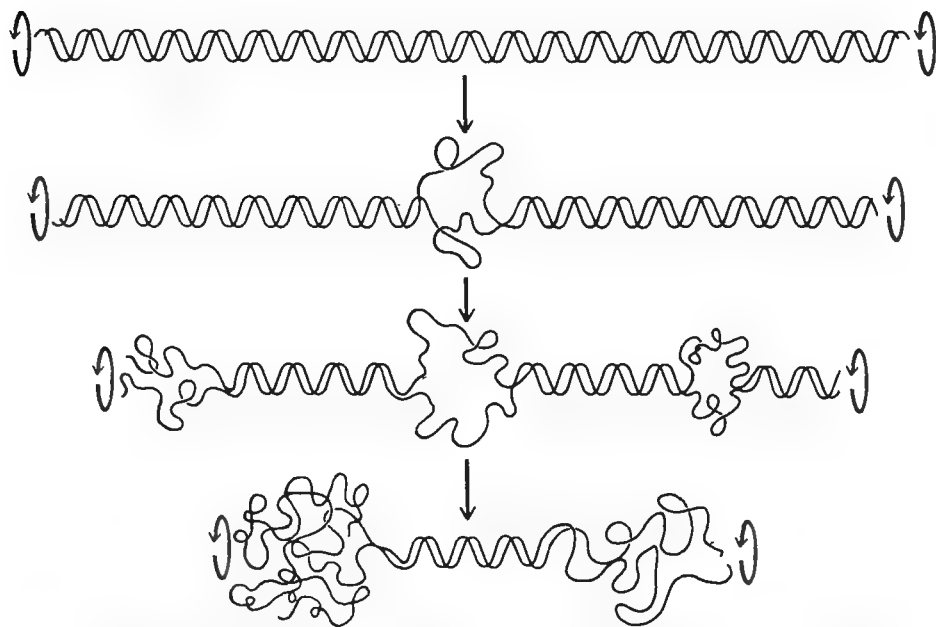


РИС. 23.18. Лимитируемое трением расплетание ДНК. В ходе денатурации в молекуле образуются клубкообразные области. Они существенно затрудняют вращение вокруг осей оставшихся спиральных участков.

подтверждающих концепцию лимитируемой трением скорости расплетания, является наблюдавшаяся большинством исследователей зависимость скорости расплетания от вязкости раствора.

Если подвергнуть ДНК достаточно сильному денатурирующему воздействию (например, сильно увеличив pH), очень быстро, за 10^{-2} с, разрушатся все пары оснований. Однако разделения и раскручивания цепей при этом не произойдет — при понижении pH до исходной величины цепи быстро ренатурируют. Для раскручивания цепей необходимы на порядки большие времена. Можно предположить, что полученная при быстрой щелочной денатурации форма отвечает состоянию, при котором комплементарные цепи сильно перекручены. Для того чтобы эти цепи могли разойтись, должно осуществиться вращение, являющееся лимитирующим этапом. Вопрос об учете трения при оценке полного времени расплетания спирали подробно обсуждается в ряде оригинальных работ (ссылки можно найти в работе Рекорда и Зимма, 1972). Для анализа этого явления было использовано много различных приближений, и все результаты говорят о том, что полное время расплетания должно увеличиваться по крайней мере пропорционально квадрату молекулярной массы. На опыте эта зависимость изменяется от линейной до квадратичной.

Может показаться, что большие времена раскручивания затрудняют репликацию высокомолекулярных ДНК, поскольку этот процесс также должен сопровождаться раскручиванием. Однако имеются данные, что природа решила эту проблему, создав специальные ферменты — топоизомеразы. Эти ферменты в процессе функционирования связываются с ДНК и на короткое время разрывают фосфодиэфирную связь, обеспечивая локальное независимое перемещение цепей, или раскручивают двойную спираль с использованием дополнительной энергии. Необходимость такого радикального решения станет еще более понятной, когда мы рассмотрим особые свойства двухцепочечных кольцевых ДНК.

РЕНАТУРАЦИЯ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ЦЕПЕЙ

Теперь, уяснив, как трудно разделить цепи двойной спирали, мы перейдем к еще более трудной проблеме — их обратному соединению. Здесь имеются три очень сложных момента: учет упоминавшегося выше трения, образование внутрицепочечной вторичной структуры и трудность взаимного проникновения двух клубков и сближение комплементарных последовательностей для образования зародыша спиральной области. Опытным путем было установлено, что скорость ренатурации максимальна при температуре, лежащей примерно на 25° ниже T_m . Если препарат ДНК инкубировать при таких температурах, влияние внутрицепочечных шпилек будет минимальным, поскольку большая часть коротких шпилек в этих условиях нестабильна. Трудности гидродинамического характера можно свести к минимуму путем фрагментации ДНК. Такую фрагментацию можно осуществить ферментативным путем, с помощью ультразвука или других методов, основанных на использовании напряжения сдвига, а также путем жесткой щелочной обработки. В большинстве случаев мы будем считать, что все получающиеся фрагменты имеют одинаковую длину. При необходимости можно модифицировать проведенное ниже рассмотрение, с тем чтобы учесть распределение фрагментов по длинам (или даже для учета более сложных факторов).

Для сравнительно коротких фрагментов (состоящих, скажем, из 10^3 пар оснований), концентрация которых очень мала, вполне разумно считать, что лимитирующим этапом процесса ренатурации ДНК является образование зародыша спиральной области. Мы будем предполагать, что каждый образованный зародыш мгновенно разрастается до максимальных возможных размеров спиральной области (рис. 23.19). Обозначим через A и B изолированные комплементарные цепи, а через C_A и C_B — их концентрации. Пусть цепи смешиваются в момент времени $t = 0$. Образование двухцепочечного спирального ком-

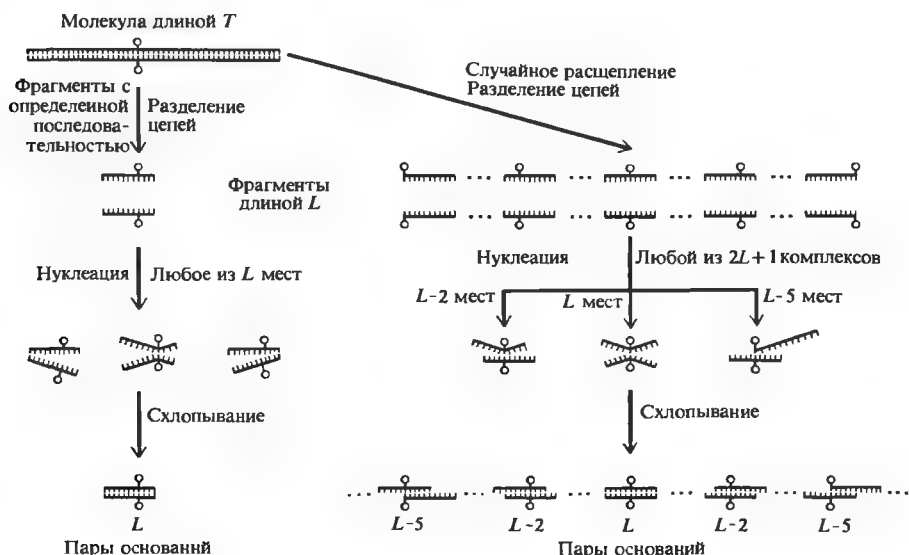


РИС. 23.19. Ренатурация небольших фрагментов ДНК. Если расщепление происходит в определенных точках молекулы, то пара оснований, отмеченная кружками, при ренатурации всегда будет находиться в полностью спаренном комплексе. При случайной фрагментации эта пара может оказаться в любом месте фрагмента длиной L . Последний может участвовать в образовании $2L + 1$ разных комплексов с зародышем двойной спирали, но лишь в одном из них смогут образоваться все L пар оснований. (См. Дополнение 23.1.)

плекса $A \cdot B$ описывается кинетическим уравнением второго порядка:

$$dC_{\text{д.ц.}}/dt = k_2 C_A C_B \quad (23.62)$$

где $C_{\text{д.ц.}}$ — концентрация двухцепочечных комплексов.

Прежде всего мы рассмотрим экспериментальные приложения уравнения (23.62), а затем вернемся к нему, чтобы пояснить смысл константы k_2 на молекулярном уровне. Предположим, что A и B получены из исходной ДНК (содержавшей T пар оснований), фрагментированной для получения небольших сегментов. Исходная ДНК имела $2T$ нуклеотидов. Полную концентрацию нуклеотидов в растворе этой ДНК, C_0 , легко измерить. Концентрация исходных молекул ДНК будет равна $C_0/2T$. Такую же концентрацию будут иметь и все уникальные фрагменты, полученные после фрагментации исходной ДНК, при условии, что в последней нет повторяющихся последовательностей, что она гомогенна и что при нарезании получают определенные, неперекрывающиеся фрагменты. В общем случае, однако, концентрация двухцепочечных фрагментов с определенной последовательностью будет равна $C_{\text{полн}} = nC_0/2T$, где n является мерой гетерогенности (< 1) и числа повторов (> 1) в исходной ДНК.

Уравнение (23.62) можно упростить, введя в него в явном виде концентрации отдельных фрагментов. В любой момент времени комплементарные фрагменты могут или образовывать спиральный комплекс, или оставаться в виде отдельных цепей. Если через $C_{\text{о.ц.}}(t)$ обозначить концентрацию одиночных цепей данного сорта, а через $C_{\text{д.ц.}}(t)$ — концентрацию соответствующих спиральных комплексов, то будет выполняться равенство

$$C_{\text{полн}} = nC_0/2T = C_{\text{о.ц.}}(t) + C_{\text{д.ц.}}(t) \quad (23.63)$$

Поскольку в начальный момент времени мы имели изолированные цепи в равных концентрациях,

$$C_{\text{о.ц.}}(t) = C_A = C_B = nC_0/2T - C_{\text{д.ц.}}(t) \quad (23.64)$$

Используя это соотношение, можно переписать уравнение (23.62) в виде

$$-dC_{\text{о.ц.}}/dt = k_2 C_{\text{о.ц.}}^2 \quad (23.65)$$

Интегрирование от момента времени 0 до момента t дает

$$[1/C_{\text{о.ц.}}(t) - 1/C_{\text{о.ц.}}(0)] = k_2 t \quad (23.66a)$$

или

$$C_{\text{о.ц.}}(t)/C_{\text{о.ц.}}(0) = 1/[1 + k_2 t C_{\text{о.ц.}}(0)] \quad (23.66b)$$

Для начальных условий, которые соответствуют отсутствию двухцепочечных комплексов при $t = 0$, находим из уравнения (23.63), что $C_{\text{о.ц.}}(0) = nC_0/2T$. Следовательно, отношение $C_{\text{о.ц.}}(t)/C_{\text{о.ц.}}(0)$ является просто долей $f_{\text{о.ц.}}$ оставшихся одиночных цепей в данный момент времени, и поэтому мы получаем

$$f_{\text{о.ц.}}(t) = C_{\text{о.ц.}}(t)/C_{\text{полн}} = 1/(1 + nC_0 k_2 t/2T) \quad (23.67)$$

Отметим, что время, при котором $f_{\text{о.ц.}} = 0,5$, равно $(C_0 t)_{1/2} = 2T/nk_2$.

РАЗМЕР ГЕНОМА И ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Кинетическое уравнение, описывающее процесс ренатурации [уравнение (23.67)], широко применяется на практике. Предположим, что ДНК гомогенна и в ней отсутствуют повторы. Тогда величина $(C_0 t)_{1/2}$ будет прямо пропорциональна молекулярной массе исходной нефрагментированной ДНК. В действительности, даже если исходная ДНК содержала одно- и двухцепочечные разрывы в небольшой концентрации, это не скажется на конечном результате, поскольку до ренатурации все молекулы все равно разрезаются на фрагменты небольшой длины. Это означает, что, измерив параметр $(C_0 t)_{1/2}$, можно найти молекулярную массу генома, при условии что выделенный препарат содержит весь геном и является гомогенным. На практике размеры генома изменяются в огромных пределах — от менее чем 10^4 пар оснований для небольших вирусов до 10^9 пар для эукариот. Это означает, что время ренатурации при постоянной концентрации нуклеотидов изменяется в 10^5 раз.

Предположим, что препарат до фрагментации представляет собой смесь ДНК двух видов, а и б, с существенно различающимися молекулярными массами. Если нуклеотидные последовательности у этих ДНК различаются по всей длине молекулы, каждая из них будет ренатурировать независимо. Наблюдаемая величина $f_{\text{о.ц.}}(t)$ будет равна

$$f_{\text{о.ц.}}(t) = \chi_a/(1 + \chi_a C_0 n_a k_{2a} t/2T_a) + \chi_b/(1 + \chi_b C_0 n_b k_{2b} t/2T_b) \quad (23.68)$$

где χ_a и χ_b — мольные доли нуклеотидов в ДНК этих двух видов. В соотношении учитывается то, что собственные константы скорости ренатурации для двух данных ДНК могут различаться¹. Если T_a и T_b очень сильно отличаются друг от друга, ренатурация двух

¹ Константы скоростей ренатурации для двух ДНК будут различны, если у этих ДНК, например, неодинаково GC-содержание. На самом деле такие эффекты малы, и вносимые ими возмущения легко учесть.

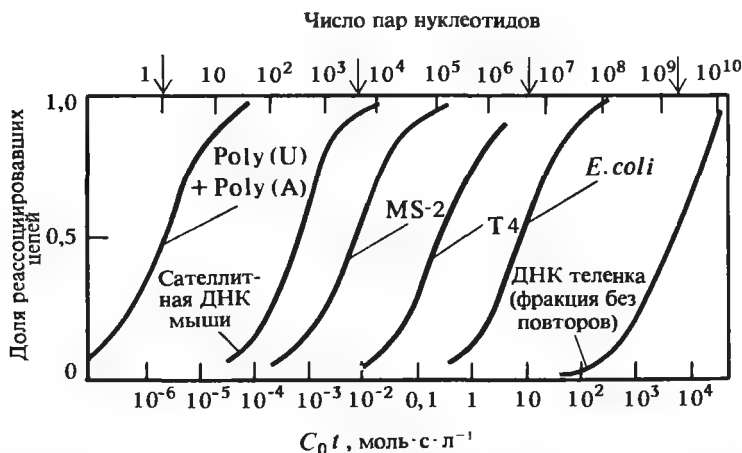


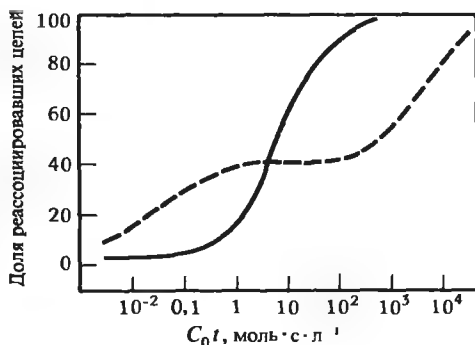
РИС. 23.20. Кинетика ренатурации ДНК различного происхождения. Все образцы были фрагментированы до размеров, отвечающих 400 нуклеотидам в одиночных цепях. По оси абсцисс отложено время ренатурации, умноженное на общую концентрацию нуклеотидов. Вверху указан параметр кинетической сложности X_c для некоторых образцов ДНК. (Britten R. J., Kohne D. E., Science, **161**, 529, 1968.)

ДНК будет проходить в совершенно разных временных масштабах, и для каждой из ДНК ее можно будет наблюдать независимо. В результате можно определить экспериментально χ_a и χ_b , даже если параметры n , k_2 и T неизвестны. Это является следствием узости временного интервала, в котором происходит большая часть реакции второго порядка. Примеры характерных кинетических кривых такого рода приведены на рис. 23.20.

Если ДНК содержит повторы, после фрагментации соответствующие сегменты будут присутствовать в большей концентрации, чем сегменты с уникальными последовательностями. Поэтому ренатурация повторов будет идти быстрее, что учитывает множитель n в уравнении (23.67). Из рис. 23.20 видно, что poly (A · U) и сателлитная ДНК мыши ренатурируют несравненно быстрее, чем другие ДНК. Если гомогенная ДНК содержит повторы с различной кратностью, удобно ввести так называемый параметр кинетической сложности, X_c . Параметр кинетической сложности — это такая длина цепи ДНК, в которой содержится по одной копии каждого уникального участка всей последовательности. Для последовательности, в которой все повторы имеют одинаковую кратность, $X_c = T/n$. Уравнение (23.67) позволяет экспериментально определить X_c при условии, что была проведена калибровка константы k_2 . Для гомополимера $X_c = 1$; для чередующейся последовательности типа d(AT) · d(AT) $X_c = 2$; для уникальной последовательности без повторов $X_c = T$. Изучение кинетики ренатурации позволяет получить определенную информацию о средней повторяемости последовательностей, если известен размер генома.

На практике при изучении ренатурации ДНК эукариот обычно наблюдаются кинетические кривые нескольких типов. Типичные экспериментальные данные такого рода представлены на рис. 23.21. Небольшая доля ДНК ренатурирует столь быстро, что соответствующую часть кинетической кривой проследить не удастся. Эта часть материала имеет очень низкую кинетическую сложность ($X_c < 60$) и должна соответствовать простым повторяющимся последовательностям типа сателлитной ДНК. Сюда следует также отнести палиндромные последовательности, в которых всегда может происходить внутримолекулярная ренатурация с образованием шпилек. Затем имеется большой класс последо-

РИС. 23.21. Кинетика ренатурации ДНК *E. coli* (сплошная кривая) и ДНК из тимуса телянка (пунктирная кривая). В последнем препарате можно выделить три класса последовательностей: уникальные, для которых $C_0 t \approx 10^3$; последовательности со средней кратностью повторов, $C_0 t \approx 10^{-1}$; небольшие последовательности с высокой кратностью повторов и палиндромные последовательности, $C_0 t < 10^{-3}$. Наличие повторов приводит к тому, что часть ДНК из тимуса телянка ренатурирует быстрее, чем ДНК *E. coli*, хотя у последней размер генома значительно меньше. (Britten R. J., Kohne D. E., Science, 161, 529, 1968.)



вательностей с параметром кинетической сложности от 10^3 до 10^7 ; это так называемые умеренные повторы (повторы средней кратности), которые должны присутствовать в эукариотическом геноме в десятках — десятках тысяч копий. Наконец, имеется уникальная ДНК, для которой параметр X_c равен размеру генома. Долю каждого класса и соответствующий параметр кинетической сложности можно определить с помощью уравнения (23.68) или его многокомпонентных аналогов. Некоторые типичные результаты такого анализа приведены в табл. 23.7. Разбить последовательности на определенные классы

Таблица 23.7

СОДЕРЖАНИЕ ПОВТОРОВ В НЕКОТОРЫХ ГЕНОМАХ¹⁾

Организмы и классы последовательностей ДНК	Число копий на геном	Процент генома	X_c
Теленок			
Уникальные последовательности	1	55	$1,5 \cdot 10^9$
Повторы средней кратности	60 000	38	$1,7 \cdot 10^4$
Повторы высокой кратности	1 000 000	2	60
Повторы высокой кратности и/или палиндромы	—	3	—
Жаба			
Уникальные последовательности	1	54	$1,6 \cdot 10^9$
Повторы средней кратности			
медленно ренатурирующие	20	6	$1,5 \cdot 10^7$
ренатурирующие с промежуточной скоростью	1600	31	$6,0 \cdot 10^5$
быстро ренатурирующие	32 000	6	$6,0 \cdot 10^3$
Повторы высокой кратности и/или палиндромы	—	3	—
Морской еж			
Уникальные последовательности	1	38	$3,0 \cdot 10^8$
Повторы средней кратности			
медленно ренатурирующие	20-50	25	$1,0 \cdot 10^7$
ренатурирующие с промежуточной скоростью	250	27	$1,0 \cdot 10^6$
быстро ренатурирующие	6000	7	$1,3 \cdot 10^4$
Повторы высокой кратности и/или палиндромы	—	3	—

¹⁾ Davidson E., Britten R., Quart. Rev. Biol., 48, 565, 1973.

бывает довольно трудно. В принципе такое разбиение возможно лишь тогда, когда диапазон значений параметров кинетической сложности для данного класса значительно уже, чем различия в этом параметре для соседних классов.

● СМЫСЛ КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ РЕНАТУРАЦИИ

Попытаемся теперь пояснить смысл наблюдаемой константы скорости ренатурации второго порядка k_2 . Описанные ранее исследования олигонуклеотидов показывают, что для возникновения зародыша двойной спирали необходимо образование более чем одной пары оснований. Общее число участков нуклеации для цепи ДНК длиной T составляет βT , где β — плотность участков нуклеации, т.е. среднее число участков в расчете на один нуклеотид (так что $\beta \leq 1$). Для ДНК с повторами общее число различающихся участков нуклеации равно βX_c . Для изолированных цепей, разрезанных одинаковым образом на фрагменты длиной L с полной концентрацией нуклеотидов, равной C_0 , начальная концентрация любого уникального участка нуклеации равна $\beta n C_0 / 2T = \beta C_0 / 2X_c$. (Для случайной фрагментации ДНК см. Дополнение 23.1.)

Дополнение 23.1

КИНЕТИКА РЕНАТУРАЦИИ ДНК, ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ СЛУЧАЙНЫМ ОБРАЗОМ

Модель кинетики ренатурации, описываемая уравнениями (23.63) — (23.67), применима лишь для ДНК, фрагментированной рестриктазами. При всех других способах расщепления разрывы происходят в случайных местах и в растворе содержится набор фрагментов с перекрывающимися последовательностями. На рис. 23.19 показано, какие эффекты могут наблюдаться при изучении кинетики ренатурации такой фрагментированной ДНК.

Если разрывы наносятся в определенных точках, концентрация каждого одноцепочечного сегмента будет равна $C_0/2T$. Каждый фрагмент из L нуклеотидов имеет L возможных точек нуклеации спиральной области, если считать (для простоты), что одна пара оснований может образовывать зародыш спиральной области. Пусть столкновения между комплементарными участками нуклеации характеризуются константой скорости бимолекулярной реакции k_n . Тогда суммарная начальная скорость нуклеации данного типа фрагментов будет равна $k_n(C_0/2T)^2 L$. Каждая цепь исходной ДНК была расщеплена на T/L фрагментов. Суммарная скорость нуклеации равна $k_n(C_0/2T)^2 T$. За каждым актом нуклеации следует быстрое разрастание спиральной области и образование двухцепочечных фрагментов из L пар оснований. Поэтому начальная скорость образования пар оснований для определенного типа фрагментов будет равна $k_n(C_0/2T)^2 L^2$. Для раствора в целом суммарная скорость образования пар оснований будет равна $k_n(C_0/2T)^2 L T$.

Предположим теперь, что ДНК расщеплена случайным образом на фрагменты длины L и цепи этих фрагментов разделены. Каждое основание исходной последовательности будет присутствовать в L разных одноцепочечных фрагментах, концентрация каждого из которых в растворе равна $(1/L)(C_0/2T)$. Каждый отдельный маленький участок может образовать зародыш спирали с любым из L фрагментов комплементарной цепи, содержащих нужную область. Таким образом, всего может быть образовано $2L - 1$ зародышей спирали (рис. 23.19). Скорость возникновения таких комплексов должна быть пропорциональна n , длине взаимно комплементарных областей, где $1 < n \leq L$; это дает для скорости нуклеации выражение $k_n(C_0/2LT)^2 n$. Общая скорость нуклеации для одного фрагмента является суммой по всем возможным $(2L - 1)$ способам образования комплексов:

$$k_n(1/L^2)(C_0/2T)^2 \left(L + 2 \sum_{n=1}^{L-1} n \right) = k_n(C_0/2T)^2$$

Образование зародыша спирали из цепей, имеющих взаимно комплементарный участок длины n , приведет в общем случае к быстрому разрастанию спирального участка до длины L . Поэтому скорость образования отдельных фрагментов равна

$$k_n(1/L^2)(C_0/2T)^2\left(L^2 + 2 \sum_{n=1}^{L-1} n^2\right) = k_n(C_0/2T)^2(2L/3 + 1/3L)$$

Всего в растворе имеется $T - L \cong T$ (для $T \gg L$) различных фрагментов. Поэтому наблюдаемая скорость нуклеации равна $k_n(C_0/2T)^2T$, а наблюдаемая скорость образования пар оснований должна составлять

$$k_n(C_0/2T)^2T(2L/3 + 1/3L)$$

Таким образом, случайная фрагментация не оказывает никакого влияния на суммарную начальную скорость образования зародышей спирали. Это и понятно, поскольку общая концентрация потенциальных зародышей спирали остается прежней. Однако при случайной фрагментации наблюдаемая скорость образования комплементарных пар (для больших длин) уменьшается при этом в

$$\frac{k_n(C_0/2T)^2T(2L/3 + 1/3L)}{k_n(C_0/2T)^2LT} = 2/3 + 1/3L^2 \cong 2/3$$

Поэтому уравнение (23.67) остается справедливым при случайной фрагментации, и ренатурация, как и ранее, описывается кинетическим уравнением второго порядка, но наблюдаемая константа скорости k_2 должна составлять $2/3$ от величины, получающейся при расщеплении ДНК на фрагменты определенной длины. Это уменьшение связано с сокращением средней длины комплементарных областей в комплексах, которые возникают при случайной фрагментации.

Будем рассматривать процесс нуклеации как столкновение двух комплементарных участков. Скорость нуклеации для одного уникального участка равна просто $k_n(\beta C_0/2X_c)^2$, где k_n — константа скорости нуклеации. Всего, однако, имеется βX_c таких уникальных участков. Далее, каждый акт нуклеации приводит к образованию комплекса, содержащего L пар оснований, где L — длина фрагментов ДНК. Поэтому для полной начальной скорости образования пар оснований можно написать уравнение

$$dC_{д.у.}/dt = k_n\beta^3L(C_0/2X_c)^2X_c \quad (23.69)$$

Если нам ничего не известно о кинетической сложности или длине фрагментов, начальную скорость можно представить в виде

$$dC_{д.у.}/dt = k_2(C_0/2)^2 \quad (23.70)$$

где $C_0/2$ — просто концентрация нуклеотидов, принадлежащих одной комплементарной цепи. Поэтому наблюдаемая константа равна

$$k_2 = k_n\beta^3L/X_c \quad (23.71)$$

Это выражение правильно предсказывает, что наблюдаемая начальная скорость обратно пропорциональна параметру кинетической сложности. Сопоставлять уравнения (23.62—23.67) и (23.69—23.71) нужно с осторожностью. Ранее мы предполагали, что скорость нуклеации для всех участков одинакова и вводили поправку на множественность участков с помощью фактора n . Теперь n входит неявно в нашу экспериментальную константу скорости через параметр кинетической сложности X_c . Константа нуклеации для

уникального участка k_n не зависит от кинетической сложности, но она может зависеть от длины фрагментов.

Рассматривая образование олигонуклеотидных комплексов, мы обнаружили, что k_n несколько меняется с длиной, но имевшиеся данные были недостаточно точны для количественных оценок и касались очень узкого диапазона длин цепей. Дж. Уэтмуре и Н. Дэвидсону (J. G. Wetmur, N. Davidson, 1968) удалось исследовать поведение k_2 в широком диапазоне длин на препаратах фрагментированной ДНК. Они установили, что $k_2 \propto L^{1/2}$. Из этого соотношения, а также из уравнения (23.71), должно следовать, что $k_n \propto L^{-1/2}$. Характер такой зависимости, по-видимому, определяется в основном эффектами исключенного объема. Для нуклеации должно произойти взаимное проникновение двух клубков, чтобы комплементарные основания могли подойти друг к другу. При увеличении длины все большая и большая доля оснований в одиночных цепях не может участвовать в нуклеации, и эффективное число участков нуклеации уменьшается. Уэтмур и Дэвидсон показали, что этот эффект действительно может объяснить наблюдаемую пропорциональность k_n величине $L^{-1/2}$.

Другим фактором, который следует принять во внимание, является рост спиральных областей. По мере увеличения длины рассматриваемых фрагментов скорость разрастания не может оставаться значительно больше скорости нуклеации. Поэтому наше предположение, что каждый акт нуклеации вызывает быстрое образование L пар оснований, перестает быть справедливым для длинных фрагментов, и даже если пренебречь эффектами исключенного объема, зависимость k_2 от длины фрагментов будет более слабой, чем линейная.

В действительности при фрагментации ДНК получают сегменты не только заданной длины L , но образуется некоторое распределение по длинам. Поэтому в соответствии с приведенными выше доводами образование спиральных областей не должно представляться реакцией второго порядка в чистом виде, поскольку константа скорости не является постоянной. Особенно серьезные трудности должны быть связаны с фрагментами, длина которых достаточна для образования протяженных участков с внутримолекулярной вторичной структурой.

Здесь мы вновь возвращаемся ко всем тем осложнениям, которые перечислены на рис. 23.14. К счастью, в данном случае ситуация не безнадежна. В реальных ситуациях эти осложнения существуют всегда, и методы, которые позволяют определять лишь общее число образовавшихся пар оснований (такие, как спектрофотометрия), не дают простой кинетики второго порядка даже для ДНК, в которой отсутствуют повторы. Выход состоит в том, чтобы регистрировать нуклеацию, а не образование пар оснований. При использовании такой методики снимается вопрос о скорости разрастания спиральных областей. Кроме того, как следует из предыдущего рассмотрения, оказывается несущественной точная зависимость k_2 от длины фрагментов. Однако некоторая зависимость k_n от длины фрагментов может оставаться.

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Наиболее распространенным методом для регистрации образования зародышей спиралей (в действительности для любых ренатурационных измерений) является хроматография на гидроксипатите. По неясным пока причинам молекулы ДНК даже с короткими спиральными участками (50 пар оснований, а возможно, и значительно меньше) задерживаются на гидроксипатите в тех условиях, когда одиночные цепи полностью вымываются. Поэтому, просто измеряя количество оставшихся на колонке фосфатных групп ДНК, можно оценить количество цепей ДНК, в которых имелись зародыши спирализации. Было показано, что полученные таким образом кинетические кривые являются обычными

кривыми второго порядка, описываемыми уравнениями, которые были получены в предыдущем разделе.

Использование хроматографии на гидроксипатите (или других физических методов разделения) открывает целую новую область в экспериментальном исследовании ренатурации. Измерение поглощения света позволяет определить лишь общее количество ренатурировавшего материала; при этом вклад в поглощение достаточно маленького участка может быть весьма невелик. Однако, если использовать ДНК, меченную радиоактивными изотопами, с помощью методов разделения можно изучать ренатурацию следовых количеств компонент. При этом следовое количество известной, не содержащей примесей ДНК может быть добавлено к исследуемой сложной системе или же ренатурация может проводиться при избытке известной чистой ДНК и следовых количеств исследуемой компоненты.

ПРИМЕНЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЕНАТУРАЦИИ

Прекрасной иллюстрацией высокой эффективности кинетического анализа ренатурации как метода исследования служит его применение для поиска фрагментов вирусного генома в трансформированной вирусом культуре клеток. Вопрос состоял в том, присутствовал ли в клетках данной ткани весь геном аденовируса. Препарат меченной атомами ^{32}P аденовирусной ДНК был обработан рестриктазой, так что ДНК расщепилась на шесть уникальных, неперекрывающихся фрагментов. Каждую из фракций после очистки смешивали с суммарной трансформированной ДНК крысы, подвергнутой фрагментации, и следили за кинетикой ренатурации. Как следует из уравнения (23.67), наблюдаемое время полуреакции для ренатурации одной из очищенных фракций фрагментированной вирусной ДНК при общей концентрации мононуклеотидов $C_{\text{вир}}$ составляет $t_{\text{вир}, 1/2} = 1/K_0 C_{\text{вир}}$, где K_0 является функцией длины и кинетической сложности данного фрагмента. Для доли оставшихся к моменту времени t одиночных цепей уравнение (23.67) может быть переписано как

$$f_{\text{о.ц.}}^{-1} = 1 + t/t_{\text{вир}, 1/2} \quad (23.72)$$

Когда данная фракция фрагментированной ДНК смешивается со всей клеточной ДНК, в которой имеется какое-то число копий этого фрагмента, общая концентрация фрагмента будет равна $C_{\text{поли}} = (1 + G)C_{\text{вир}}$, где G — отношение числа молей фрагментов вирусной ДНК в геноме клетки к числу молей добавленных фрагментов. В этом случае ренатурация описывается соотношением [следующим из уравнения (23.67)]

$$f_{\text{о.ц.}}^{-1} = 1 + (1 + G)t/t_{\text{вир}, 1/2} \quad (23.73)$$

Таким образом можно определить G . Если общее количество клеточной ДНК известно, через G можно выразить число копий фрагмента вирусной ДНК в геноме клетки. Некоторые типичные результаты описанного эксперимента приведены на рис. 23.22. Представленные данные ясно показывают, что фрагмент В отсутствует в клеточной ДНК, в то время как фрагмент С в ней содержится. Когда были проведены такие же опыты со всеми рестрикционными фрагментами, оказалось, что три фрагмента из шести присутствуют в количестве приблизительно полутора копий на каждый хозяйский геном, один присутствует в количестве менее одной копии на геном и два полностью отсутствуют. Эксперименты такого типа позволяют идентифицировать те участки вирусной ДНК, которые ответственны за трансформацию клеток.

Другим типичным примером применения кинетического метода является исследование расположения повторяющихся последовательностей в геноме. Рассмотрим две крайние

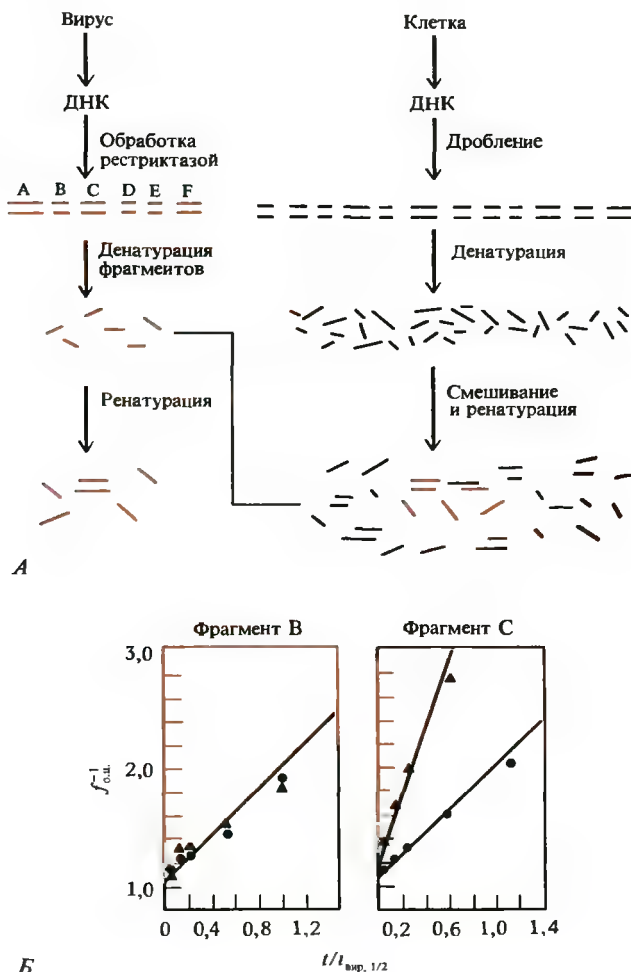
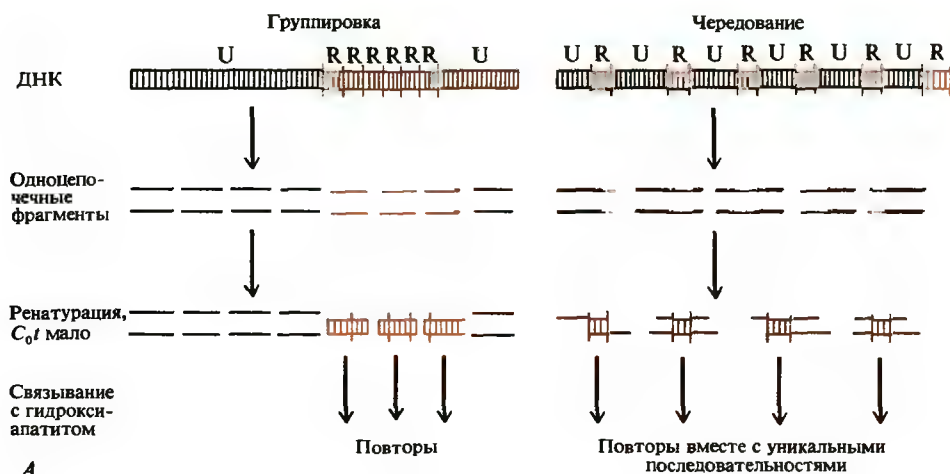
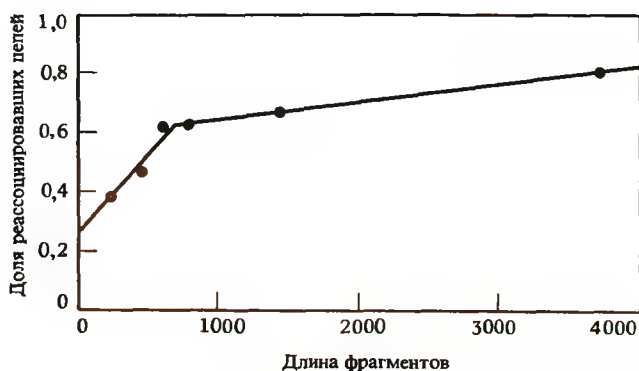


РИС. 23.22. Использование кинетики ренатурации для анализа наличия последовательностей ДНК аденовируса 2 в эукариотической клетке. А. Схематическое изображение метода. Очень большой избыток клеточной ДНК смешивается с малым количеством меченых рестрикционных фрагментов вирусной ДНК. Если вирусные последовательности присутствуют в клеточной ДНК, суммарная концентрация комплементарных к данному фрагменту последовательностей увеличивается, поэтому меченые фрагменты ренатируются быстрее. Б. Экспериментальные результаты для двух фрагментов аденовирусной ДНК, смешанных с ДНК из трансформированных вирусом клеток (▲) и с ДНК из нетрансформированных контрольных клеток (●). (Flint S. J. et al., J. Mol. Biol., 96, 47, 1975.)

модели (рис. 23.23, А). В каждой модельной ДНК отношение повторяющихся и уникальных последовательностей одинаково, но в одном случае короткие последовательности обоих классов разбросаны по молекуле, а в другом они полностью разделены. Предположим, что обе ДНК фрагментированы до размеров, значительно меньших длины одного повтора. Условия ренатурации выбирают таким образом, чтобы C_0t было достаточно велико для реассоциации большей части повторов, но при этом почти все уникальные по-



А



Б

РИС. 23.23. Использование кинетики реассоциации для анализа схемы расположения уникальных и повторяющихся последовательностей в эукариотическом геноме. А. Схематическое изображение случайной фрагментации и реассоциации для двух предельных моделей расположения последовательностей. Повторяющиеся последовательности выделены цветом. При тех значениях параметра C_0t , когда могут образоваться комплексы лишь из повторяющихся последовательностей, в рамках модели чередующихся уникальных участков и повторов должно наблюдаться образование комплексов для большинства фрагментов, если их размер несколько больше длины повторяющихся участков. В рамках модели сгруппированных повторов при той же фрагментации не должно наблюдаться образования комплексов уникальными последовательностями. Б. Зависимость доли реассоциировавших фрагментов ДНК *Xenopus laevis* при $C_0t = 50$ от длины. Эти результаты показывают, что справедлива модель с чередованием уникальных и повторяющихся участков. (Davidson E., Britten R., Quart. Rev. Biol., 48, 565, 1973.)

следовательности еще находились в одноцепочечной форме. Для обеих моделей распределения последовательностей при хроматографическом разделении на гидроксипатите должно быть зарегистрировано одно и то же количество связанной ДНК. Предположим теперь, что ДНК фрагментирована до размеров, лишь незначительно превышающих длину повторяющихся последовательностей. Тогда, если справедлива первая модель, в которой

последовательности двух классов разбросаны по молекуле, многие уникальные последовательности ДНК будут входить в состав фрагментов вместе с повторами. Ренатурация фрагментов с такими последовательностями пойдет значительно быстрее, чем фрагментов только с уникальной первичной структурой.

Тщательный анализ зависимости количества ренатурировавшей ДНК от длины фрагментов позволяет определить среднюю длину участков с повторами и с уникальными последовательностями. Например, результаты, представленные на рис. 23.23,Б, показывают, что около 65% уникальных последовательностей ДНК содержат повторы, расположенные в среднем через 700 нуклеотидов. У других 20% таких последовательностей повторы встречаются приблизительно через 4000 нуклеотидов. Такие данные оказываются чрезвычайно полезными при анализе последовательности геномов эукариот. Этот пример служит прекрасной иллюстрацией того, как с помощью физико-химических методов можно решать очень важные биологические вопросы.

МИГРАЦИЯ ТОЧЕК ВЕТВЛЕНИЯ

До сих пор мы рассматривали лишь простейшие кинетические процессы, включающие спаривание онований и возникновение стэкинга. Известны, однако, более сложные структурные превращения, и один из таких процессов, который привлек к себе пристальное внимание, — это миграция точек ветвления (рис. 23.24).

Миграция одноцепочечных точек ветвления происходит, по-видимому, при вытеснении новосинтезированной РНК цепями ДНК в ходе транскрипции. Она наблюдалась экспериментально в ренатурировавших кольцевых ДНК с одноцепочечными разрывами, которые были образованы молекулами с циклически переставленными последовательностями. Точка ветвления в такой системе будет совершать случайные блуждания до тех пор, пока не произойдет разделения цепей или не образуется какая-то особенно стабильная промежуточная структура. Измерения показывают, что скорость миграции превышает 1000 пар оснований в секунду.

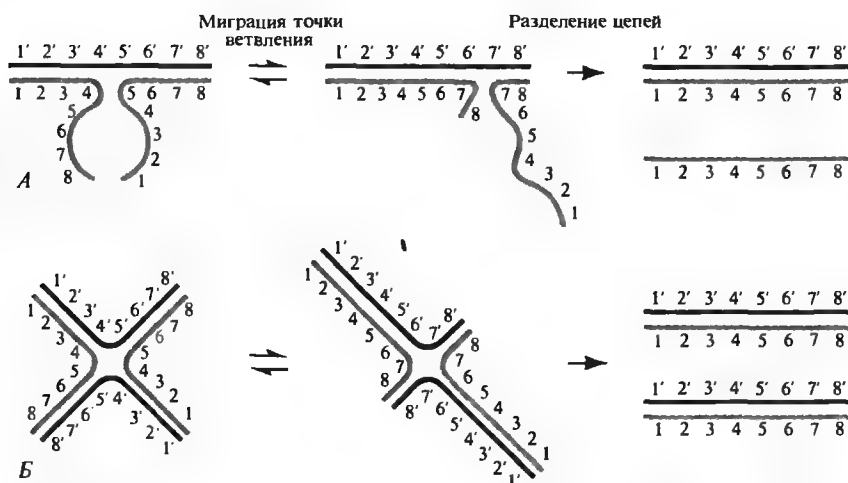


РИС. 23.24. Схематическое изображение моделей миграции точек ветвления. А. Миграция одноцепочечных точек ветвления. Б. Миграция двухцепочечных точек ветвления. Числа со штрихами и без штрихов соответствуют комплементарным последовательностям.

Миграция двухцепочечных точек ветвления представляет собой более сложный процесс, поскольку при этом должны быть разорваны одновременно две изолированные пары оснований (пары 5 — 5 и 5' — 5' на рис. 23.24,Б), чтобы смогли образоваться две другие пары (пары 5' — 5 и 5 — 5'). Скорость миграции двухцепочечных точек ветвления была определена путем прямого электронно-микроскопического наблюдения за исчезновением крестообразных структур, образующихся как промежуточное неустойчивое состояние. Эти структуры были получены при низкой температуре, затем температуру повышали и следили за их релаксацией. Точка ветвления смещается случайным образом до тех пор, пока не достигнет конца спирали и не произойдет необратимое разделение структуры на две двойные спирали. Хотя надежно зарегистрировать удастся лишь последний процесс, эти измерения позволяют оценить скорость миграции точки ветвления путем машинного моделирования случайных блужданий. Было найдено, что скорость смещения точки ветвления составляет 6000 элементарных смещений (на одну пару оснований) в секунду при 37°C и около 1 смещения в секунду при 0°C. Считается, что миграция двухцепочечных точек ветвления играет роль в процессе генетической рекомбинации.

23.3. Связывание нуклеиновых кислот с молекулами меньшего размера

В гл. 22 мы использовали термодинамический подход для того, чтобы показать, как связывание малых молекул сдвигает равновесие между одно- и двухцепочечными формами. На биологические свойства ДНК и РНК влияет множество самых разных малых молекул, даже если последние присутствуют в небольших количествах и не приводят к изменению структуры ДНК и РНК в целом. К таким малым молекулам относятся мутагены и канцерогены (например, аминоквадрины и полициклические ароматические углеводороды), антибиотики (такие, как актиномицин D), различные красители с плоской стереохимической структурой (некоторые из них, например этидий, используют как лекарственный препарат) и многочисленные тяжелые металлы (одни из них связываются с фосфатными группами, другие — с основаниями). На рис. 23.25 приведены структурные формулы нескольких наиболее хорошо изученных соединений такого рода.

Кроме малых молекул, с нуклеиновыми кислотами могут связываться многие специфические макромолекулы. Сюда относятся белки, ответственные за упаковку ДНК в хроматине или РНК в рибосомах, белки, участвующие в репликации или транскрипции ДНК, а также белки, регулирующие биологическую активность нуклеиновых кислот. Некоторые свойства таких белков перечислены в табл. 23.8, из которой видно, что между ними очень мало общего. Возможно, в связывании с нуклеиновыми кислотами участвует лишь часть белковой молекулы. Сделать какие-либо четкие выводы о наличии таких участков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, можно будет лишь после того, как удастся установить структуру этих связывающихся белков.

Сформулируем общие принципы и подходы, необходимые для описания взаимодействия идентичных и эквивалентных малых молекул с одним линейным участком молекулы нуклеиновой кислоты. Детальный анализ будет проведен только для тех молекул, которые связываются одновременно лишь с несколькими основаниями. Однако многие вопросы и явления, касающиеся поведения таких молекул, должны оставаться справедливыми и для более крупных лигандов.

Когда рассматривается связывание малых молекул с нуклеиновыми кислотами, возникают следующие вопросы:

1. Наблюдается ли предпочтительное связывание с РНК или с ДНК? С двух- или одноцепочечными структурами?

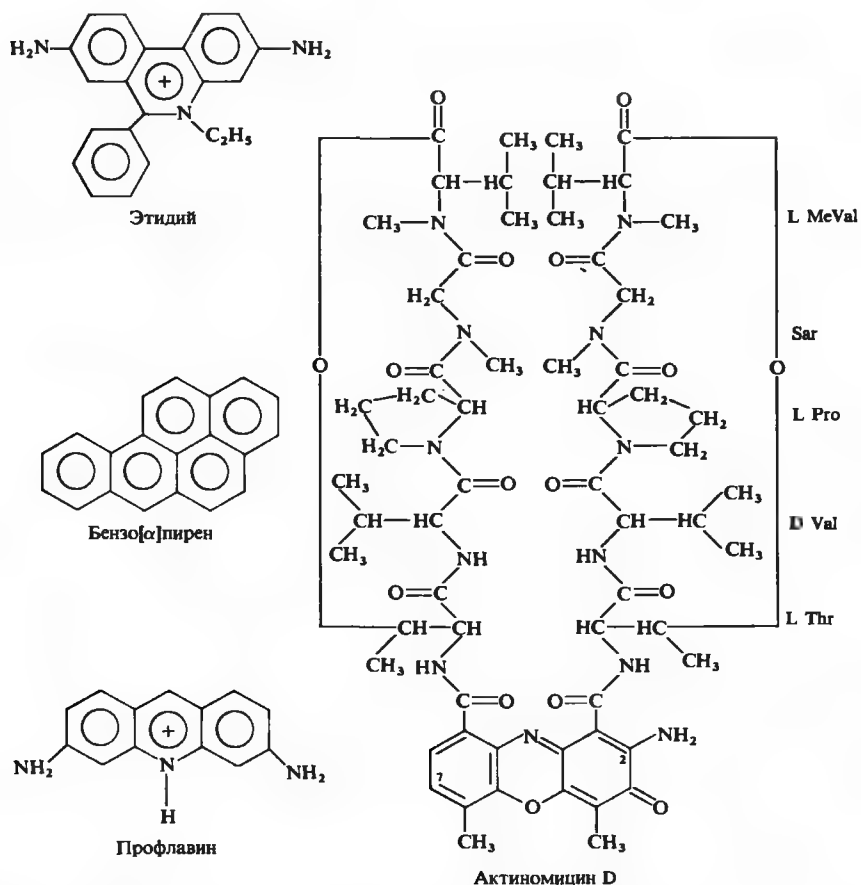


РИС. 23.25. Структуры четырех малых молекул, которые, как полагают, связываются с двойной спиралью ДНК путем интеркаляции. Sar — саркозин; MeVal — метилвалин.

2. Как измерить константу связывания и число мест связывания?
3. Связывается ли лиганд с любым участком молекулы нуклеиновой кислоты или лишь с определенными парами оснований или последовательностями?
4. Связываются ли малые молекулы с внешней поверхностью спирали? Если да, то сохраняется ли при этом структура спирали?
5. Проникают ли малые молекулы внутрь спирали? Очень распространенным способом связывания является интеркаляция, при которой плоские лиганды встраиваются между соседними парами оснований. Как это влияет на физические свойства нуклеиновых кислот?
6. Влияет ли связывание лиганда с данным участком нуклеиновой кислоты на связывание с соседним участком? Здесь могут наблюдаться кооперативные эффекты, когда связывание рядом с уже связавшимся лигандом более вероятно, чем с любым другим местом, и антикооперативные, когда наблюдается обратная картина.

СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ¹⁾

Белок	Молекулярная масса	Субъединицы	Изoeлектрическая точка	Специфичность к одно- или двуцепочечной форме ²⁾	Специфичность к последовательности	Длина области связывания	Константа связывания, M^{-1} , при $0,05 M Na^+$	Кооперативность, $\{ \}$ на рнс. 23.27 ³⁾
<i>lac</i> -Репрессор	150 000		~6	Д.л. ДНК	Очень высокая	13	10^{14}	1
λ -Репрессор	26 000-104 000	α_4 $\alpha_1 \neq \alpha_2 \neq \alpha_4$	—	« « «	« « «	~17	—	?
Белок гена 32 фага T4	35 000	1	5,5	О.л. ДНК	Отсутствует	~10	10^6	1000
РНК-полимераза <i>E. coli</i>	480 000	$\alpha_2\beta'\sigma$	—	Лучше д.л. ДНК	Умеренно высокая	~40	10^{13}	?
Гистоны	11 000-22 000	1	~14	—	Отсутствует	~20	—	?
Рибосомный белок S4	25 000	1	10,4	рРНК	Очень высокая	>200	—	1
Аминоацетил-тРНК-синтаза	70 000-200 000	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_4$ или $\alpha_2\beta_2$	—	тРНК	Умеренно высокая	40?	~ 10^7	?
Рибосомный белок S1	68 000	1	5,0	1-е место связывания: О.л. ДНК или РНК	Отсутствует	4	10^6	1
				2-е место связывания: О.л. РНК	Пиримидины	10	10^6	30

¹⁾ Данные предоставлены П. фон Хнппелем.²⁾ О.л. — одноцепочечная, д.л. — двуцепочечная.³⁾ 1 — отсутствие кооперативности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ

Изучение связывания неизбежно начинается с поисков методов определения доли связанных лигандов при данной их суммарной концентрации $(M)_0$. Из уравнения материального баланса можно определить молярную концентрацию (m) свободных лигандов, если известно количество связанных молекул, и наоборот

$$(M)_0 = (m) + \bar{\nu}(NA) \quad (23.74)$$

где $\bar{\nu}$ — число связанных молекул в расчете на пару оснований нуклеиновой кислоты, а (NA) — полная молярная концентрация пар оснований. Эта номенклатура сложилась в результате изучения тех лигандов, которые связываются с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами.

Для регистрации связывания обычно используются спектроскопические методы. Если характерное время измерения для данного метода меньше времени связывания, наблюдаемые свойства малых молекул всегда являются средними свойствами свободных и связанных молекул, при условии что имеется лишь один вид спектроскопически различимых мест связывания:

$$A = (m)A_{\text{своб}} + \bar{\nu}(NA)A_{\text{связ}} \quad (23.75)$$

где A — наблюдаемый оптический параметр, $A_{\text{своб}}$ и $A_{\text{связ}}$ — соответствующие параметры для свободных и связанных лигандов в расчете на один моль; все эти параметры измеряют при одной и той же длине волны. Если имеется несколько спектроскопически различных типов мест связывания, второй член в соотношении (23.75) должен быть заменен суммой по всем этим типам.

Уравнение (23.75) и его аналоги справедливы для поглощения, интенсивности или анизотропии флуоресценции, КД и ДОВ¹. В общем случае $A_{\text{своб}}$ получают, измеряя соответствующие характеристики чистого раствора малых молекул; $A_{\text{связ}}$ находят путем экстраполяции измеренных значений величины A к пределу бесконечного отношения числа пар оснований к числу молекул лиганда, когда предположительно все лиганды связаны. Соотношения (23.74) и (23.75) можно рассматривать как два линейных уравнения с двумя неизвестными, (m) и $\bar{\nu}$. Поэтому количество связанных и свободных лигандов легко определить.

Некоторые методы позволяют регистрировать только свободные лиганды. Например, при потенциометрическом титровании раствора pH соответствует концентрации свободных протонов (H^+). Количество связанных протонов можно найти из соотношения (23.74), поскольку количество добавленных в раствор протонов известно. Эквивалентными методами для ионов металлов являются кондуктометрическое титрование или методы, основанные на использовании специфических ионных электродов. Многими методами можно регистрировать лишь связанные лиганды. Сюда относятся всевозможные методы, основанные как на исследовании биохимических эффектов, так и на изменении в результате связывания физико-химических свойств макромолекул (таких, как кажущаяся молекулярная масса, плавучая плотность, вязкость и спектроскопические свойства макромолекул). Они могут быть использованы для регистрации равновесного связывания, но

¹ Для методов с характерным временем измерения, превышающим времена связывания, соотношение (23.75) может быть иным по форме, но анализ экспериментальных данных часто проводится таким же образом. Например, соотношение (23.75) справедливо для химического сдвига в спектре ЯМР в пределе быстрого обмена, но неприменимо для спектральных интенсивностей, измеренных на определенной частоте.

лишь при условии, что удастся соотнести наблюдаемые изменения свойств макромолекул с количеством связанных лигандов. Нередко наблюдаемые свойства линейно зависят от числа связанных молекул, и тогда проблема становится тривиальной.

В простейшей модели связывания предполагается, что имеется B мест связывания, причем все они термодинамически и спектроскопически эквивалентны. Связывание с каждым местом и происходящее при этом изменение спектроскопического параметра совершенно не зависят от того, произошло ли связывание с соседними местами. Для такой модели равновесия связывание с любым участком характеризуется обычной макроскопической константой связывания

$$K = (\text{Занятые места})/(\text{m})(\text{Свободные места}) \quad (23.76)$$

а уравнение (23.75) дает число занятых мест связывания. В модели, предполагающей, что места связывания независимы, статистические веса состояний, соответствующих полному насыщению мест связывания в одной цепи, не требуют специального учета (гл. 15). Поскольку места связывания независимы, равновесие не изменится, если увеличить концентрацию макромолекул в B раз и считать, что каждая макромолекула содержит лишь одно место связывания.

Если обозначить через B_0 число мест связывания в расчете на пару оснований, можно записать условие равновесия (23.76) через величины, определенные соотношением (23.74):

$$K = \tilde{v}(\text{NA})/(\text{m})[B_0(\text{NA}) - \tilde{v}(\text{NA})] \quad (23.77)$$

Исключив концентрацию пар оснований, получим

$$\tilde{v}/(\text{m}) = K(B_0 - \tilde{v}) \quad (23.78)$$

Это очень полезное уравнение является основой широко известного графика Скэтчарда. С его помощью можно определить как кажущуюся константу связывания K , так и число мест связывания в расчете на пару оснований B_0 . График зависимости $\tilde{v}/(\text{m})$ от $\tilde{v}$ представляет собой прямую. Ее наклон равен K , а B_0 равно значению $\tilde{v}$ в точке, которая получается при экстраполяции $\tilde{v}/(\text{m})$ к нулю. Кривая I на рис. 23.26 представляет собой пример линейного графика Скэтчарда.

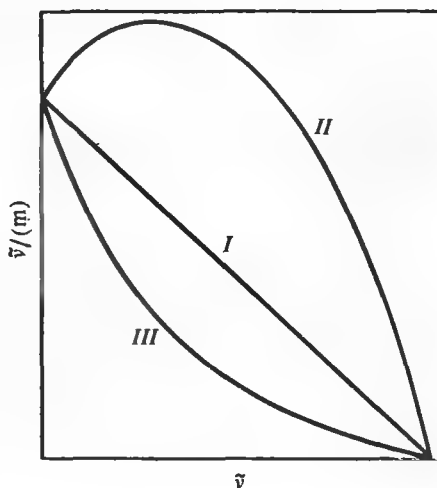


РИС. 23.26. Графики Скэтчарда для трех моделей связывания лигандов с ДНК. Параметр $\tilde{v}$ равен числу связанных молекул лиганда в расчете на пару оснований; через (m) обозначена концентрация свободных лигандов. Кривая I отвечает модели, в которой связывание с каждым местом происходит независимо от состояния других мест. Кривая II отвечает модели кооперативного связывания, когда связывание лиганда рядом с уже занятым местом более выгодно. Кривая III соответствует антикооперативному связыванию, когда связывание лиганда рядом с уже занятым местом оказывается менее выгодным.

В следующей простейшей модели равновесного связывания предполагается, что существуют два типа независимых мест связывания, число которых равно B_{10} и B_{20} на пару оснований, с константами связывания K_1 и K_2 соответственно. Уравнение (23.78) остается справедливым для каждого из типов мест связывания, и, если имеется некоторый способ определения числа связанных молекул лигандов $\bar{\nu}_1$ и $\bar{\nu}_2$ по отдельности, то можно найти константы K_1 , K_2 , B_{10} и B_{20} . Во многих случаях, однако, экспериментально удается определить лишь общее число связанных молекул, $\bar{\nu} = \bar{\nu}_1 + \bar{\nu}_2$. С помощью формулы (23.78), записанной для каждого из типов мест связывания, можно получить выражение для $\bar{\nu}$:

$$\bar{\nu}/(m) = K_1 B_{10} + K_2 B_{20} - K_1 \bar{\nu} + (K_1 - K_2) K_2 B_{20} [K_2 + 1/(m)] \quad (23.79)$$

Из-за последнего члена в (23.79) график зависимости $\bar{\nu}/(m)$ от $\bar{\nu}$ становится нелинейным. Однако при наличии достаточно точных экспериментальных данных уравнение (23.79) позволяет определить четыре параметра связывания. Такой анализ рассмотрен в разд. 15.4.

Учет взаимодействия между местами связывания приводит к дальнейшему усложнению модели. Притяжение связанных лигандов, или кооперативное взаимодействие, может иметь различную природу. Соседние лиганды, связанные с наружной поверхностью спирали, могут взаимодействовать непосредственно. Например, между связанными с фосфатными группами плоскими молекулами катионов может возникать взаимодействие, аналогичное стэкингу оснований внутри спирали. Связывание, которое сопровождается нарушением спиральной структуры, будет приводить к увеличению вероятности связывания с соседними участками, если это нарушение затрагивает не только саму область связывания, но распространяется и дальше. Допустим, например, что лиганд стабилизирует петли. Инициация петель затруднена, а ее увеличение при связывании следующей молекулы лиганда будет происходить значительно легче.

Взаимное отталкивание связанных лигандов, или их антикооперативное взаимодействие, также может иметь разную природу. Крупные лиганды могут контактировать только с одной или двумя парами оснований, но стерически препятствовать подходу других молекул лиганда к соседним местам связывания. Сближение лигандов при их связывании с соседними участками может быть просто термодинамически невыгодным. Чтобы получить представление о тех трудностях, с которыми приходится сталкиваться при более детальном анализе, рассмотрим связывание катионов. Такие лиганды при связывании с соседними участками будут отталкиваться друг от друга, но, кроме того, при этом изменится локальная противоионная атмосфера, так что электростатическая свободная энергия всего полимера будет иной, что необходимо учитывать при анализе экспериментов по связыванию.

ОПИСАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ СОСЕДНИМИ МЕСТАМИ СВЯЗЫВАНИЯ ИЛИ СОСЕДНИМИ ЛИГАНДАМИ СТАТИСТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Чтобы преодолеть те трудности, с которыми связан учет взаимодействия между соседними лигандами, можно использовать методы статистической термодинамики. Мы ограничимся учетом взаимодействия лишь ближайших соседей, но наше рассмотрение является достаточно общим и легко может быть распространено на более сложные случаи. Другой подход для учета взаимодействия соседних лигандов описан в гл. 15.

Допустим, что все места связывания эквивалентны. Пусть константа равновесия для связывания лиганда в том случае, когда соседние места свободны, равна $k = \exp(-\Delta G_{\text{св}}/RT)$. Если два лиганда связываются рядом, полное изменение энергии системы будет равно $2\Delta G_{\text{св}}^0 + \Delta G_{\text{вз}}$, где $\Delta G_{\text{вз}}$ соответствует взаимодействию соседних

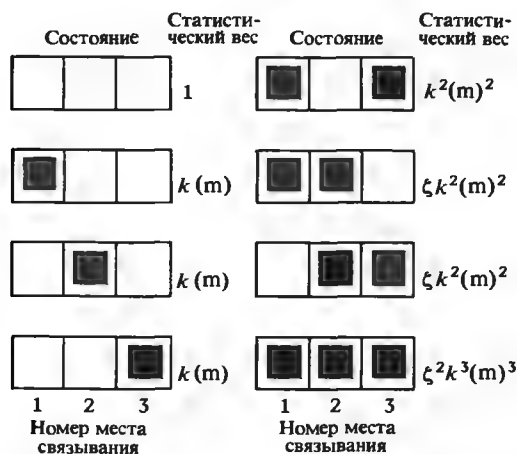


РИС. 23.27. Возможные состояния системы при заполнении трех соседних мест связывания на полинуклеотидной двойной спирали. При интеркаляции эти три места образуются четырьмя соседними парами оснований. Справа указаны ненормированные вероятности возникновения каждого из этих состояний; k — это константа связывания со свободным местом, параметр ξ характеризует взаимодействие между ближайшими соседними местами связывания, а через (m) обозначена концентрация свободных лигандов.

лигандов. Поэтому константа равновесия, соответствующая образованию данного состояния, равна $k_{11} = k^2\xi$, где $\xi = \exp(-\Delta G_{вз}/RT)$. Для кооперативного взаимодействия $\xi > 1$, для антикооперативного $\xi < 1$. На рис. 23.27 изображены возможные состояния системы, в которой имеется три места связывания. Записать выражение для количества связанных лигандов при заданной концентрации свободных лигандов довольно сложно даже для такой простой системы.

Изменение свободной энергии ΔG_i , сопровождающее связывание n_i лигандов одним из тех способов, которые представлены на рис. 23.27, при концентрации свободных лигандов (m) равно

$$\Delta G_i = \Delta G_i^0 - n_i RT \ln(m) \quad (23.80)$$

Мы выбрали здесь в качестве стандартного изменение свободной энергии при концентрации лигандов 1 М, т.е. $\Delta G_i^0 = -RT \ln K_i$, где K_i — константа равновесия для образования данной конфигурации лигандов на молекуле нуклеиновой кислоты. При таком определении ΔG_i^0 свободная энергия отсчитывается от состояния, отвечающего полностью свободной от лигандов нуклеиновой кислоте, поскольку для этого состояния ΔG_i^0 и n_i равны нулю.

Для описания равновесия в сложной системе используется понятие статистического веса W_i , которое было введено в разд. 20.1. Статистический вес состояния определяется как

$$W_i = e^{-\Delta G_i/RT} \quad (23.81)$$

Используя соотношение (23.80) и определение ΔG_i^0 , можно записать выражение для статистического веса в виде

$$W_i = K_i(m)^{n_i} \quad (23.82)$$

На рис. 23.27 приведены статистические веса всех состояний системы с тремя местами связывания. Из этого рисунка следует, что в K_i включается множитель k , отвечающий

каждому занятому месту связывания, и дополнительный множитель ζ , отвечающий каждой паре соседних занятых мест связывания. Поэтому для системы с произвольным числом мест связывания статистический вес W_i может быть найден путем последовательного анализа заданной конфигурации при перемещении от левого конца к правому. При этом W_i должен домножаться на

1	для каждого свободного места связывания
$k(m)$	для каждого занятого места связывания, слева от которого находится свободное место
$\zeta k(m)$	для каждого занятого места связывания, слева от которого находится занятое место

Статистический вес полностью свободной от лигандов нуклеиновой кислоты равен единице. Таким образом, статистические веса, задаваемые уравнением (23.82), соответствуют относительным вероятностям появления состояний с тем или иным расположением лигандов. Абсолютная вероятность P_i вычисляется путем нормировки относительной вероятности данной конфигурации на сумму относительных вероятностей по всем возможным состояниям:

$$P_i = W_i / \sum_i W_i \equiv K_i(m)^{n_i} / Q \quad (23.83)$$

где Q — это конфигурационная статистическая сумма системы, определяемая как

$$Q \equiv \sum_i e^{-\Delta G_i / RT} = \sum_i K_i(m)^{n_i} \quad (23.84)$$

Любой параметр системы должен вычисляться путем усреднения по всем конфигурациям. Интересующий нас параметр — это среднее число $\langle n \rangle$ связанных лигандов:

$$\langle n \rangle = \sum_i n_i P_i = (1/Q) \sum_i n_i K_i(m)^{n_i} \quad (23.85)$$

Соотношение (23.85) можно представить в виде

$$\langle n \rangle = \frac{(m)}{Q} \frac{d}{d(m)} \left(\sum_i K_i(m)^{n_i} \right) = \frac{(m)}{Q} \frac{dQ}{d(m)} \quad (23.86)$$

Если полимер содержит N пар оснований, средняя доля занятых мест связывания $\bar{\nu}$ равна

$$\bar{\nu} = \langle n \rangle / N = N^{-1} d(\ln Q) / d[\ln(m)] \quad (23.87)$$

Таким образом, если мы можем вычислить Q для данной модели, то мы можем найти и $\bar{\nu}$ как функцию концентрации свободных лигандов (m) .

● МАТРИЧНЫЙ МЕТОД ВЫЧИСЛЕНИЯ СТАТИСТИЧЕСКОЙ СУММЫ

В гл. 20 мы использовали матричный метод Зимма — Брэга для построения всех возможных конфигураций полипептида. Здесь мы применим тот же подход для нахождения суммы по всем состояниям, учитываемым в уравнении (23.84), и вычислим таким образом статистическую сумму. Предположим, что для полного описания системы мы должны учесть взаимодействие между $(\delta + 1)$ последовательными местами связывания. Начнем с описания конфигураций первых δ мест связывания. Число возможных конфигураций для последовательности из δ мест связывания равно 2^δ , поскольку каждое такое ме-

сто может быть занято или свободно. Мы можем записать статистические веса всех этих конфигураций в виде вектор-строки $\mathbf{a}_\delta$ с 2^δ элементами. Каждый элемент представляет собой статистический вес, отвечающий одной из возможных конфигураций последовательности из δ элементов. Статистическая сумма для первых δ мест связывания есть сумма статистических весов для всех этих конфигураций, т.е. сумма по всем элементам вектора $\mathbf{a}_\delta$. Эту сумму можно вычислить как $\mathbf{a}_\delta \cdot \mathbf{e}$, где через $\mathbf{e}$ обозначен единичный вектор-столбец:

$$\mathbf{e} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix}$$

Например, в простой модели, учитывающей взаимодействие ближайших соседей (рис. 23.27), рассматриваются одновременно лишь пары соседних мест связывания. Первое из этих мест может быть либо занятым, либо свободным. Вектор $\mathbf{a}_1$, соответствующий этому месту связывания, равен

$$\mathbf{a}_1 = (1, k(m)) \quad \text{место 1: (занято, свободно)} \quad (23.88)$$

где $2^1 = 2$ элемента, 1 и $k(m)$ — статистические веса двух возможных состояний одного места связывания. Статистическая сумма для первого места связывания равна

$$Q_1 = \mathbf{a}_1 \cdot \mathbf{e} = (1, k(m)) \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} = 1 + k(m) \quad (23.89)$$

Чтобы найти статистическую сумму для первых двух мест связывания, необходимо учесть изменения всех статистических весов первого состояния при появлении в системе второго места связывания. Это можно сделать с помощью матрицы $\underline{\mathbf{M}}$. Элемент M_{ij} этой матрицы соответствует изменению статистического веса при добавлении второго места связывания в состоянии j к первому месту, находящемуся в состоянии i . Если индекс 1 мы припишем свободному месту связывания, а индекс 2 — занятому, то матрица $\underline{\mathbf{M}}$ будет иметь вид

$$\begin{array}{cc} & \begin{array}{c} \text{место 2} \\ \text{свободно} \quad \text{занято} \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{место 1} \\ \text{свободно} \\ \text{занято} \end{array} & \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \end{array} \quad \underline{\mathbf{M}} = \begin{pmatrix} 1 & k(m) \\ 1 & \zeta k(m) \end{pmatrix} \quad (23.90)$$

Например, $M_{12} = k(m)$ — это статистический вес состояния с занятым вторым местом связывания и свободным первым.

Вектор, элементы которого равны статистическим весам всех состояний системы с двумя местами связывания, есть

$$\mathbf{a}_1 \cdot \underline{\mathbf{M}} = (1 + k(m), k(m) + \zeta k^2(m)^2) \quad (23.91)$$

Статистическая сумма для первых двух мест связывания равна

$$Q_2 = \mathbf{a}_1 \cdot \underline{\mathbf{M}} \cdot \mathbf{e} = 1 + 2k(m) + \zeta k^2(m)^2 \quad (23.92)$$

Процедура, использованная для нахождения Q_2 из Q_1 , может быть повторена столько раз, сколько необходимо для описания состояния всего полимера:

$$Q_3 = a_1 \cdot \underline{M}^2 \cdot e \quad (23.93)$$

$$Q_N = a_1 \cdot \underline{M}^{N-1} \cdot e \quad (23.94)$$

В общем случае исходный вектор a_δ описывает состояния δ мест связывания и имеет 2^δ элементов. Матрица $\underline{M}$ определяет изменения в статистических весах M , причем ее элементы отвечают состояниям мест связывания от 1 до δ и от 2 до $\delta + 1$; таким образом, $\underline{M}$ — это матрица $2^\delta \times 2^\delta$. Статистическая сумма для полимера при этом имеет вид

$$Q_N = a_\delta \cdot \underline{M}^{N-\delta} \cdot e \quad (23.95)$$

Как правило, и a_δ , и $\underline{M}$ можно найти опытным путем даже для довольно сложных случаев (см. задачу 23.1).

● ВЫЧИСЛЕНИЕ КРИВЫХ СВЯЗЫВАНИЯ

Хотя уравнение (23.95) позволяет точно вычислить Q , в большинстве случаев пользоваться им неудобно, поскольку его конечный вид слишком сложен. Для цепей большой длины N статистическая сумма может быть аппроксимирована выражением $Q = \lambda_{\max}^N$, где $\lambda_{\max}$ является наибольшим собственным числом матрицы $\underline{M}$, а n соответствует показателю степени при $\underline{M}$ в соотношении (23.95). В общем случае лиганды могут занимать несколько соседних мест связывания. Если B_0 есть отношение числа мест связывания к числу пар оснований, статистическую сумму можно представить в виде $Q = \lambda_{\max}^{NB_0}$. Тогда из соотношения (23.87) степень связывания равна

$$\bar{v} = B_0 d(\ln \lambda_{\max})/d[\ln(m)] \quad (23.96)$$

Сначала мы покажем, как пользоваться этим соотношением в случае полностью не-кооперативного связывания, когда в (23.90) $\xi = 1$. Собственные числа матрицы $\underline{M}$ находятся из уравнения

$$\begin{vmatrix} 1 - \lambda & k(m) \\ 1 & k(m) - \lambda \end{vmatrix} = 0 = \lambda^2 - \lambda[k(m) + 1] \quad (23.97)$$

Наибольшее собственное число равно $k(m) + 1$ (другое собственное число равно нулю), и мы получаем для $\bar{v}$ следующее соотношение:

$$\bar{v} = B_0 \frac{d\{\ln[k(m) + 1]\}}{d[\ln(m)]} = (m)B_0 k/[k(m) + 1] \quad (23.98)$$

Это соотношение легко преобразовать к виду (23.78); таким образом, мы еще раз получили уравнение Скэтчарда, используя при этом значительно более общий подход.

Для модели, в которой учитывается взаимодействие ближайших соседей, представленной на рис. 23.27, мы можем принять B_0 равным единице, что соответствует единичному размеру участка связывания. Собственные числа матрицы $\underline{M}$, задаваемой формулой (23.90), определяются из уравнения

$$\begin{vmatrix} 1 - \lambda & k(m) \\ 1 & \zeta k(m) - \lambda \end{vmatrix} = 0 = \lambda^2 - \lambda[1 + \zeta k(m)] + k(m)(\zeta - 1) \quad (23.99)$$

Наибольший корень равен

$$\lambda_{\max} = (1/2)\{1 + \zeta k(m) + \sqrt{[1 + \zeta k(m)]^2 - 4k(m)(\zeta - 1)}\} \quad (23.100)$$

Это выражение вместе с соотношением (23.96) позволяет вычислить $\bar{\nu}$ и таким образом построить график Скэтчарда для $\bar{\nu}/(m)$ в зависимости от $\bar{\nu}$ при любых значениях параметров ζ и k .

Для более сложных схем связывания нахождение собственных чисел с помощью уравнений типа (23.97) и (23.99) становится очень громоздким, поскольку приходится решать кубические уравнения или уравнения более высокого порядка. Общий подход, позволяющий преодолеть эту трудность, состоит в вычислении $d(\ln \lambda)/d[\ln(m)]$ прямо из уравнения для нахождения собственных чисел. Например, уравнение (23.99) можно представить в виде

$$(\lambda^2 - \lambda)/(1 - \zeta + \lambda\zeta) = k(m) \quad (23.101)$$

Используя тот факт, что для рассматриваемой модели $B_0 = 1$, легко показать, исходя из уравнения (23.96), что

$$\bar{\nu} = \frac{d(\ln \lambda)}{d[\ln(m)]} = \frac{(m)d\lambda}{\lambda d(m)} = \frac{\zeta\lambda^2 + (1 - 2\zeta)\lambda + \zeta - 1}{\zeta\lambda^2 + 2(1 - \zeta)\lambda + \zeta - 1} \quad (23.102)$$

С помощью уравнений (23.101) и (23.102) можно выразить $\bar{\nu}/(m)$ через λ , ζ и k . При таком подходе λ является параметром, который следует определить до нахождения (m) и $\bar{\nu}$. Чтобы не возникло противоречия с соотношением (23.96), значение λ следует выбрать достаточно большим, чтобы оно попало в область изменения $\lambda_{\max}$. Каким образом можно выбрать это значение? Анализ формулы (23.100) для нахождения $\lambda_{\max}$ показывает, что $\lambda_{\max} > 1$. Поэтому достаточно заменить в уравнениях (23.101) и (23.102) λ на y^{-1} и выбрать значения y в интервале $0 \leq y \leq 1$.

На рис. 23.26 изображены изотермы связывания, построенные согласно уравнениям (23.101) и (23.102) для трех разных значений ζ . При $\zeta = 1$ мы получаем простой линейный график Скэтчарда. При $\zeta > 1$ график Скэтчарда обычно имеет максимум при некотором промежуточном значении $\bar{\nu}$. Это обусловлено кооперативностью, которая приводит к большему заполнению мест связывания при промежуточных концентрациях лигандов, чем в отсутствие взаимодействия между лигандами.

МОДЕЛЬ С ИСКЛЮЧЕНИЕМ МЕСТ СВЯЗЫВАНИЯ ПРИ ИНТЕРКАЛЯЦИИ

Особый интерес представляет случай связывания при $\zeta = 0$ (рис. 23.26). Такой выбор ζ полностью исключает возможность связывания двух молекул лиганда с соседними участками. График Скэтчарда для этого случая имеет вид вогнутой кривой и при экстраполяции дает максимальную степень заполнения $\bar{\nu} = 0,5$, что соответствует чередующимся занятым и свободным местам связывания (на каждую вторую пару приходится занятый участок). Этот предельный случай антикооперативного связывания называется моделью

с исключением мест связывания. При $\zeta = 0$ уравнение (23.102) упрощается до

$$\tilde{v} = (\lambda - 1)/(2\lambda - 1) \quad (23.103)$$

Уравнение (23.99) при этом же условии легко решается и дает $\lambda_{\max} = (1/2)[1 + \sqrt{1 + 4k(m)}]$, так что

$$\tilde{v} = (1/2)[1 - 1/\sqrt{1 + 4k(m)}] \quad (23.104)$$

При $(m) \rightarrow \infty$ предельное значение $\tilde{v}$ равно 0,5. График Скэтчарда, соответствующий уравнению (23.104), оказывается вогнутым (рис. 23.28). Отметим, что такой же график может быть получен для модели с двумя типами мест связывания, один из которых отвечает сильному, а другой слабому связыванию. Чтобы различить эти два разных с физической точки зрения случая, необходимо иметь более детальную информацию о механизме связывания. Модель с исключением мест связывания очень хорошо описывает связывание многих лигандов с ДНК. На рис. 23.28 приведены в качестве примера экспериментальные данные для связывания этидия.

При описании экспериментальных данных с помощью модели с исключением мест связывания можно варьировать лишь один подгоночный параметр — константу связывания k . Однако кажется маловероятным, чтобы большинство веществ, связывающихся с ДНК, было совершенно нечувствительно к последовательности оснований. Прекрасное согласие с моделью экспериментальных данных по связыванию этидия с ДНК означает, что влияние последовательности в основном самоусредняется точно так же, как это имеет место в случае оптических свойств гетерополимера. Поэтому исследование влияния нуклеотидной последовательности на связывание лигандов необходимо проводить на коротких олигонуклеотидах с известной последовательностью.

Весьма интересные выводы можно получить при исследовании физических аспектов взаимодействия лигандов с полинуклеотидами. Как было показано ранее, увеличение T_m при связывании лиганда означает, что лиганд связывается предпочтительно с двойной спиралью. Если при связывании увеличивается длина молекулы ДНК, а ее диаметр меняется незначительно, то, как следует из уравнений гидродинамики, рассмотренных в гл. 11 и 12, коэффициент седиментации будет падать, а характеристическая вязкость расти.

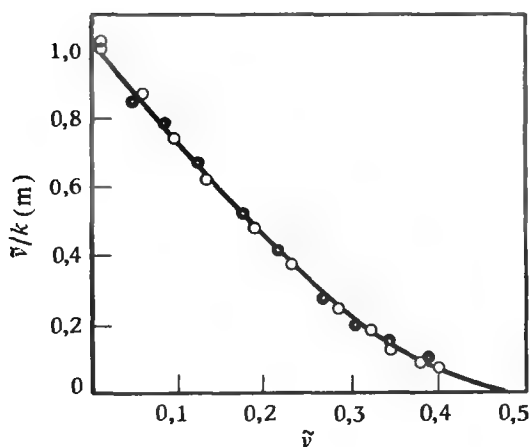


РИС. 23.28. График Скэтчарда для связывания бромистого этидия с двумя различными ДНК. ● — ДНК из тимуса телят; ○ — ДНК *M. luteus*. Расчетная кривая указывает на соответствие экспериментальных данных модели с исключением мест связывания ($\zeta = 0$). Величина $\tilde{v}/k(m)$, отложенная по оси ординат, была нормирована путем деления на константу связывания. (J. Bresloff, unpublished data.)

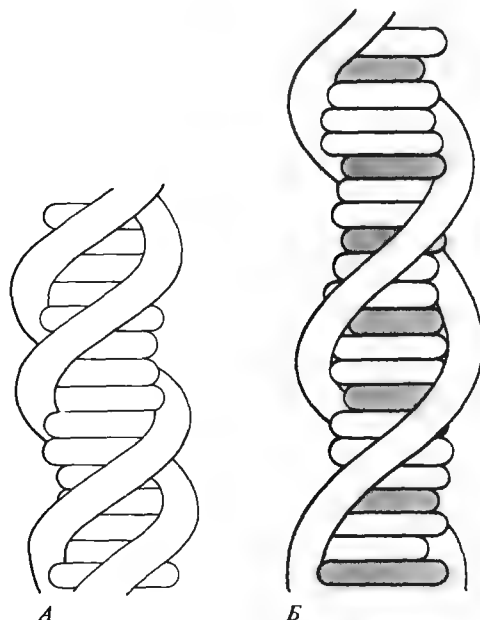
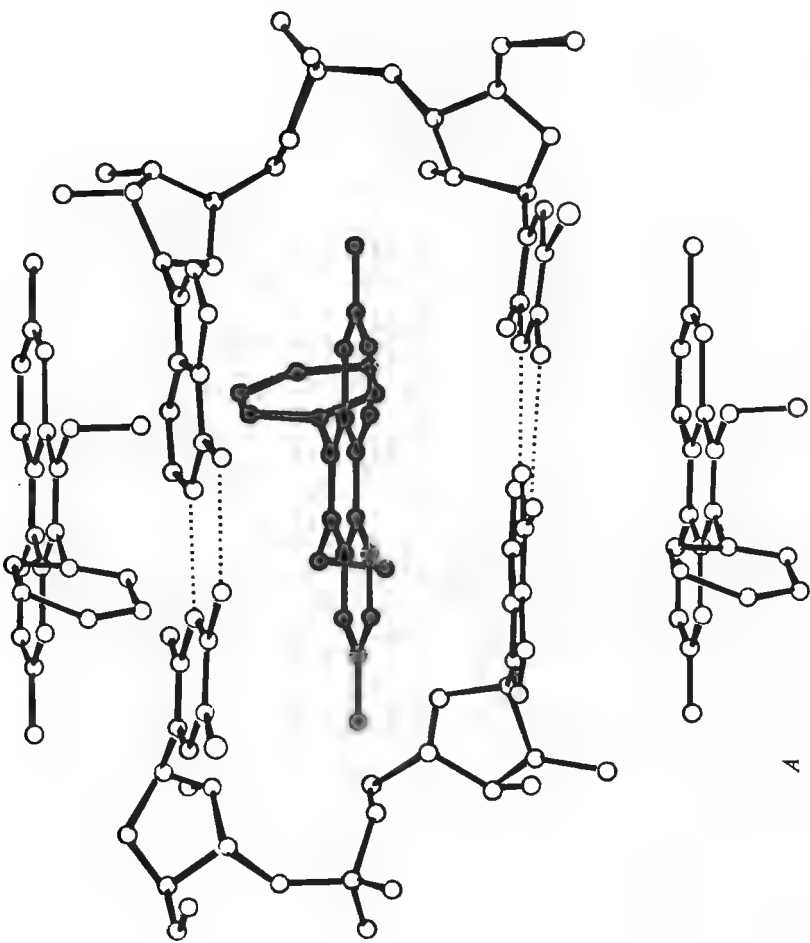


РИС. 23.29. Схематическое изображение удлинения и раскручивания двойной спирали ДНК при связывании с интеркалирующим лигандом. А. Исходная ДНК. Б. ДНК с интеркалированными лигандами. (По работе Waring M., *Nature*, **219**, 1320, 1968, с учетом изменений, сделанных в работе Lippard S. J., *Accts. Chem. Res.*, **11**, 211, 1978.)

Простейшим типом связывания, которое вызывает увеличение длины, является интеркаляция (рис. 23.29). Классический пример лиганда, который связывается путем интеркаляции, представляет собой этидий. Поскольку, согласно модели с исключением мест связывания, этидий может занимать одно место связывания на две пары оснований, в условиях насыщения длина молекулы ДНК должна увеличиться на 50% (толщина молекулы этидия примерно такая же, как и у пары оснований).

При связывании путем интеркаляции плоскость молекулы лиганда должна быть перпендикулярна оси спирали, и это можно прямо проверить с помощью измерений линейного дихроизма. Поскольку моменты основных электронных переходов этидия лежат в плоскости молекулы красителя, связанный этидий будет преимущественно поглощать свет, поляризованный в плоскости, перпендикулярной оси ДНК. Таким образом, линейный дихроизм должен быть отрицателен.

Именно такого рода исследования физических свойств связанных с ДНК лигандов привели в свое время к предположению, что этидий, акрифлавин и другие лиганды с плоской стереохимической структурой связываются с ДНК путем интеркаляции. В пользу этой модели говорили и результаты рентгеноструктурных исследований волокон, однако в присутствии связанных лигандов удавалось приготовить лишь мало упорядоченные волокна, так что получаемая информация была весьма неполной. Был проведен ряд элегантных исследований по влиянию связывания бромистого этидия на гидродинамические свойства кольцевой замкнутой ДНК, результаты которых не только находились в согласии с моделью интеркаляции, но позволили получить количественную оценку угла раскручивания двойной спирали при связывании одной молекулы лиганда. Однако всех этих дан-



А

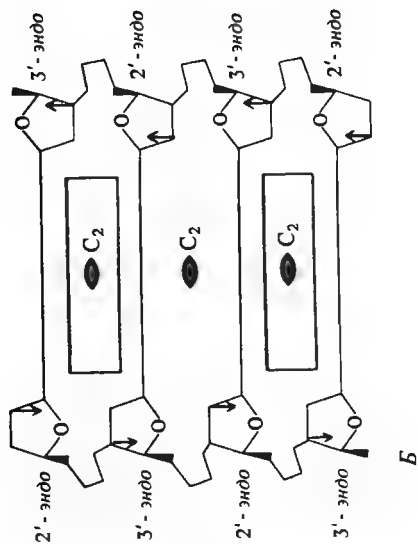
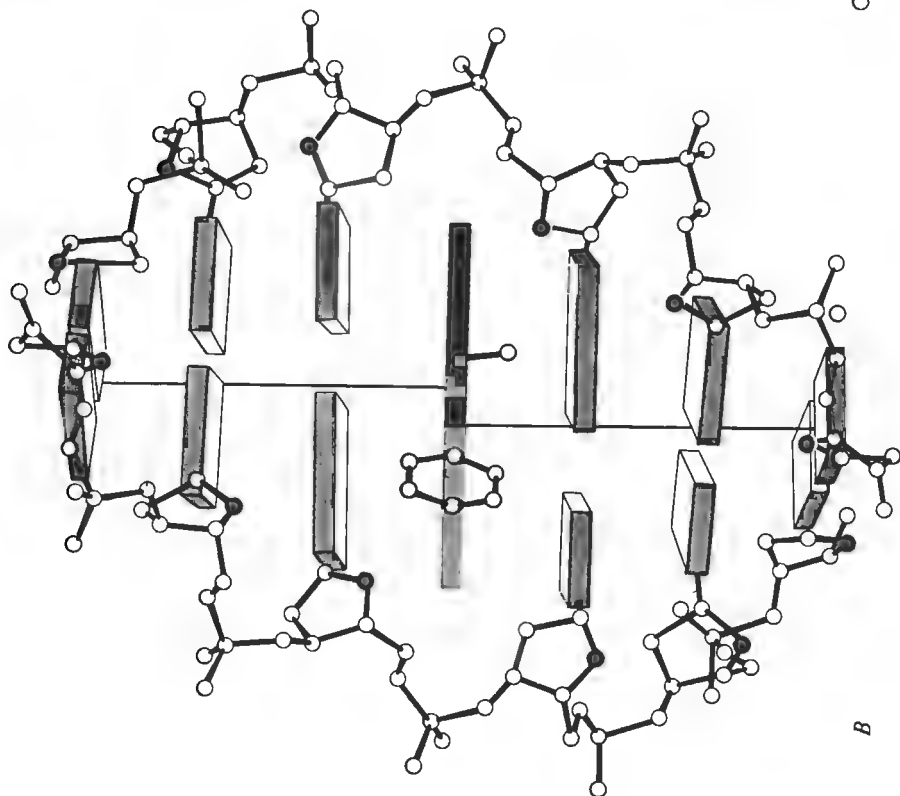
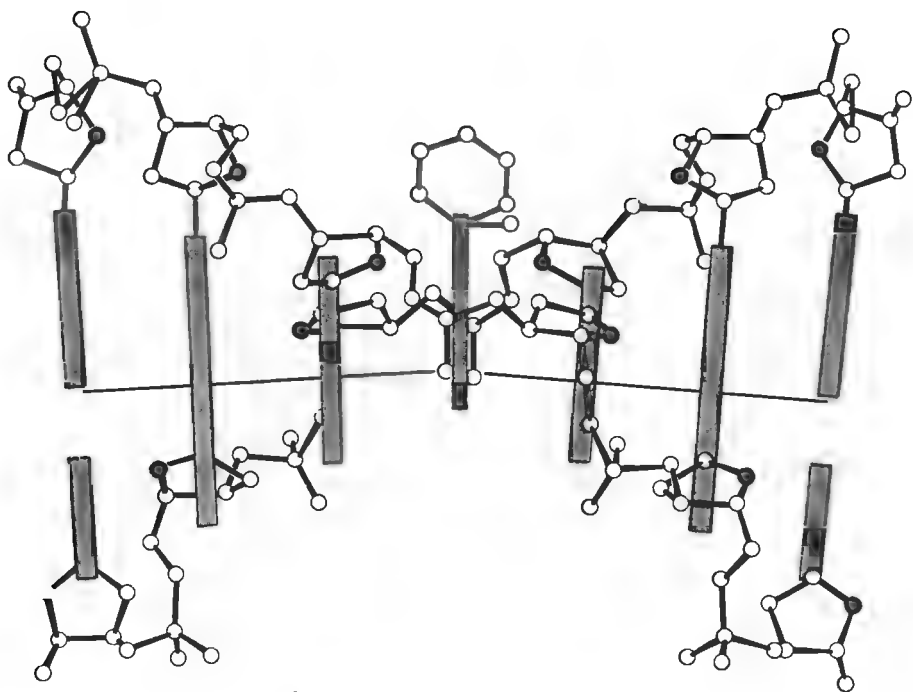


РИС. 23.30. Модель связывания бромистого этидия с ДНК. А. Структура комплекса этидия с иол-UrA (1:1), полученная с помощью рентгеноструктурных данных. Молекулы этидия интеркалированы между парами оснований динуклеотидфосфатных комплексов и пристыкованы к ним снаружи. (Tsai C. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 628, 1975.). Б. Схематическое изображение структуры двойной спирали ДНК, насыщенной интеркалированными лигандами, с учетом исключения соседних мест связывания. Обратите внимание, что чередование конформаций сахара нарушает симметрию относительно оси вращения второго порядка молекулы ДНК, но симметрия относительно осей, проходящих между парами оснований, при этом сохраняется. Такое расположение конформаций ДНК с этидием (вид в двух проекциях), учитывающая образование излома и смещение осей двойной спирали (вертикальные отрезки — локальные оси спирали). (Sobel H. M. et al., J. Mol. Biol., **114**, 333, 1977.)



B

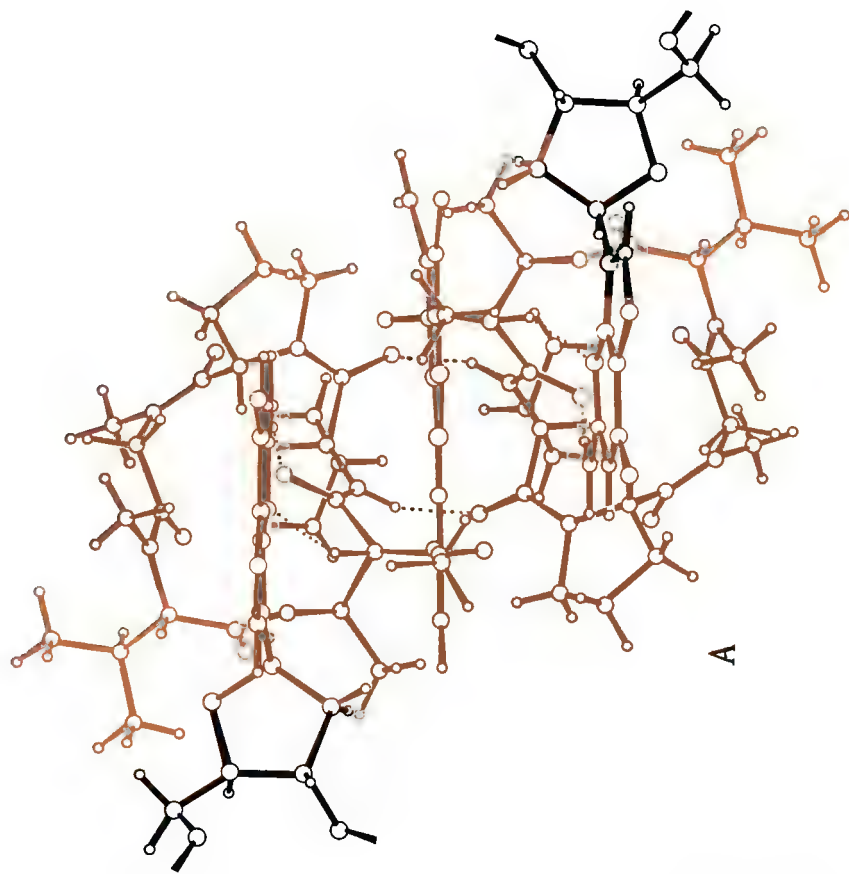
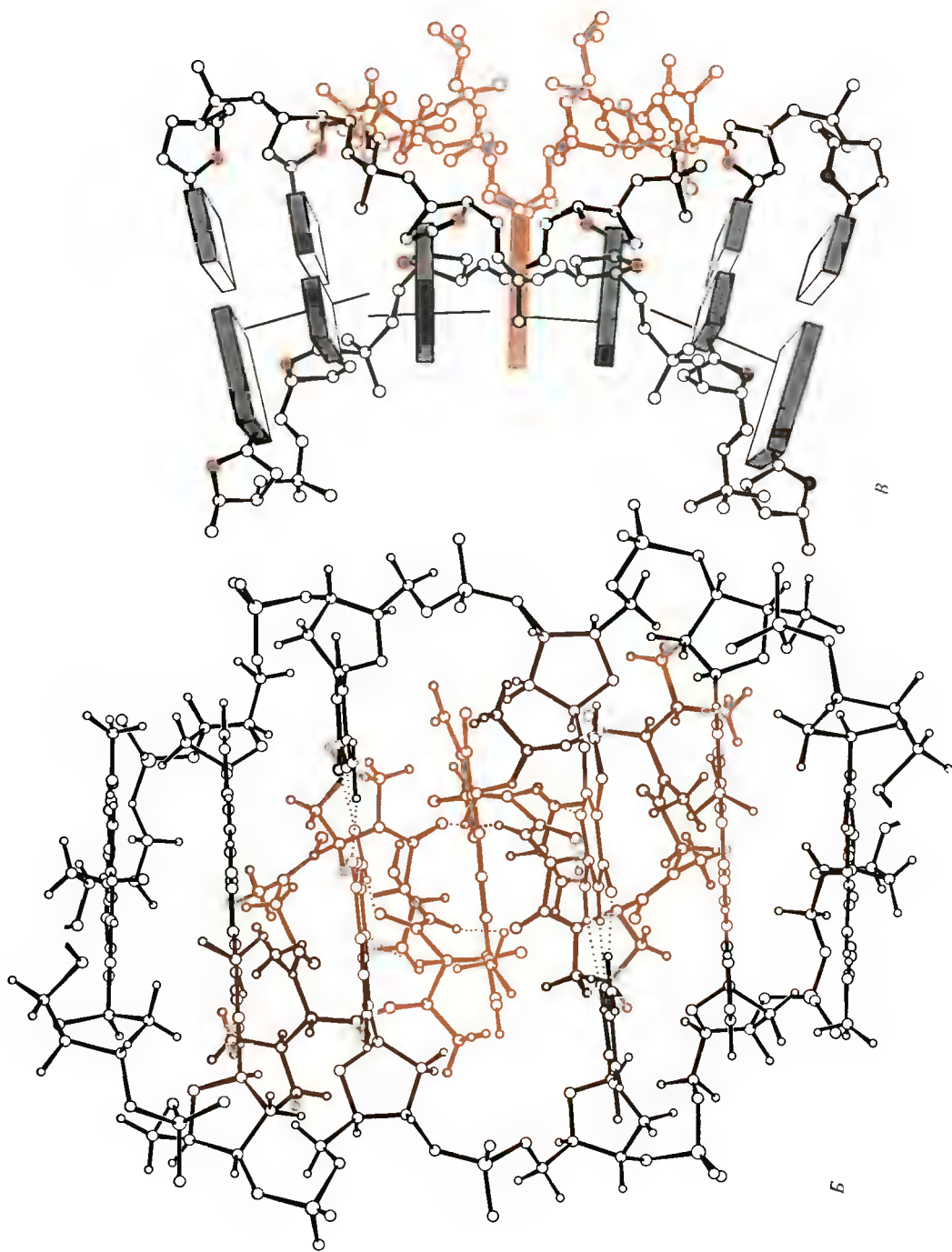


РИС. 23.31. Связывание актиномицина D с ДНК. А. Структура комплекса дезоксигуанозина (черный цвет) и актиномицина D (2:1), полученная с помощью рентгеноструктурных данных. Б. Модель интеркаляции актиномицина D в двойную спираль ДНК, полученная путем экстраполяции структуры, изображенной на рис. А. (Рис. А и Б взяты из работы Sobell H. M., Jain S. C., J. Mol. Biol., 68, 21, 1972.) В. Уточненная модель комплекса актиномицина D с ДНК, на которой хорошо виден излом спирали. Вертикальные отрезки — локальные оси спирали. (Sobell H. M. et al., J. Mol. Biol., 114, 333, 1977.)



ных было недостаточно для того, чтобы говорить об интеркаляции как о преобладающем способе связывания. И лишь недавно удалось получить волокна, которые позволили провести рентгеноструктурный анализ с высоким разрешением. В этих работах использовался интеркалирующий реагент, содержащий платину. Полученные данные полностью подтверждали модель интеркаляции с исключением соседних мест связывания.

КРИСТАЛЛЫ КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ЭТИДИЕМ

Проведенные недавно рентгеноструктурные исследования позволили определить трехмерную структуру нескольких закристаллизованных комплексов моонуклеозидов или динуклеозидфосфатов с предполагаемыми интеркаляторами. На рис. 23.30 и 23.31 изображены две такие структуры: комплекс этидия с 5-иод-УрА и актиномицина D с дезокси-гуанозином. Первый из них является типичным представителем многих простых комплексов с интеркаляцией. На нем мы остановимся подробно. Следует, однако, иметь в виду, что не все известные комплексы с интеркаляцией имеют такую структуру.

Рассматриваемая структура содержит комплекс из двух молекул 5-иод-УрА, стабилизированный водородными связями, и молекулу этидия, интеркалированную между двумя АУ-парами. Еще две молекулы этидия расположены по торцам этого образования. При такой стехиометрии на один 5-иод-УрА приходится одна молекула этидия, но этот результат не должен вводить в заблуждение. Дело в том, что кристаллы были приготовлены при низкой концентрации соли, и этидий должен был выступать в роли катиона, нейтрализующего заряд фосфатной группы. Стехиометрия 1:1 была необходима для сохранения общей электрической нейтральности. В растворе, содержащем комплексы ДНК с этидием, всегда имеется достаточное количество электролита, который предоставляет необходимые противоионы.

Структура кристаллов этидий-иод-УрА однозначно указывает на то, что интеркаляция лигандов вполне возможна. Она позволяет также сделать весьма интересные предположения о природе эффекта исключения мест связывания. Кольцо сахара в В-форме двойной спирали находится в конфигурации 2'-эндо (гл. 3), а в А-форме ДНК и в РНК-11 — в конфигурации 3'-эндо. Однако в комплексе этидия с 5-иод-УрА (рис. 23.30, А) сахар находится в конформации 3'-эндо у нуклеозидов, присоединенных через 3'-атом, и в конформации 2'-эндо у нуклеозидов, присоединенных через 5'-атом (т.е. структура соответствует 2'-эндо-иод-Ур-3'-эндо-А). Такая структура наблюдалась только в динуклеотидах и может быть обусловлена концевыми эффектами, но, если предположить, что она имеет место и в полимерах, можно прийти к весьма интересным выводам. В каждой из цепей конформации сахара 2'- и 3'-эндо могут чередоваться (рис. 23.30, Б), и это имеет два следствия. Из-за такого чередования оказывается нарушенной симметрия относительно оси вращения второго порядка, лежащей в плоскости пары оснований. Однако ось симметрии C_2 , расположенная между соседними парами оснований, может сохраняться, и эта ось будет проходить теперь через центр кольца связанного этидия.

Потенциальные места связывания, лежащие выше и ниже участка, занятого этидием, также могут иметь локальную симметрию C_2 . Однако их структура отлична от структуры занятого этидием участка, так как взаимное расположение разных конформаций сахара в этом случае противоположно (см. рис. 23.30, Б). Поэтому, если экстраполяция структуры комплекса интеркалирующего лиганда с динуклеотидом на случай полимера допустима, двойная спираль должна оказаться в такой конформации, когда чередующиеся области, заключенные между соседними парами оснований, имеют разную структуру. Теперь достаточно предположить, что интеркаляция оказывается энергетически выгодной лишь для одной из этих двух структур, и мы получим обоснование модели с исключением мест связывания. Для окончательной проверки этой привлекательной гипотезы необходимо иметь более детальные структурные данные. Отметим, что чередование конформаций са-

хара может объяснить эффект исключения мест связывания как в ДНК, так и РНК. В двойной спирали В-ДНК сахар находится в конформации 2'-эндо, и для образования комплексов с интеркалирующими лигандами необходимо, чтобы в каждом втором звене в месте связывания конформация сахара изменилась от 2'-эндо к 3'-эндо. В РНК сахар обычно находится в конформации 3'-эндо, и необходимо изменение к конформации 2'-эндо для каждого второго сахара в месте связывания.

Когда удалось построить более детальную модель комплекса этидия с ДНК, картина оказалась более сложной. На рис. 23.30,В представлена идеализированная структура комплекса этидия с В-ДНК в двух разных проекциях. Пары оснований, контактирующие с интеркалированным этидием, наклонены по отношению друг к другу. В результате возникает излом оси двойной спирали с углом 8°, если спираль В-ДНК распространяется по обе стороны от молекулы этидия. Кроме того, оси спиралей над и под молекулой этидия оказываются смещенными друг относительно друга примерно на 1 Å, подобно тому как это происходит в случае изломов, описанных в гл. 3. Из-за образования изломов полностью насыщенная этидием ДНК будет находиться в сверхспирализованном состоянии. Каждая интеркалировавшая молекула этидия приводит к раскручиванию В-спирали на угол 26°, что находится в согласии с результатами гидродинамических исследований связывания этидия с ДНК (гл. 24).

КОМПЛЕКС МЕЖДУ АКТИНОМИЦИНОМ D И ДЕЗОКСИГУАНОЗИНОМ

Концепция локальной симметрии играет важную роль и при анализе структуры комплекса актиномицина D с дезоксигуанозином (см. рис. 23.31,А). Стехиометрия этого комплекса такова, что на две молекулы дезоксигуанозина приходится одна молекула лиганда. Структура имеет ось приближительной симметрии C_2 , поворот вокруг которой переводит две молекулы дезоксигуанозина друг в друга и, кроме того, меняет местами пептидные кольца актиномицина. Комплекс из двух оснований и плоского кольца актиномицина очень похож на структуру с интеркалированным лигандом. Плоскости всех трех ароматических колец параллельны друг другу, и, если к двум гуаниновым основаниям присоединить два цитидина, структура будет иметь почти такую же геометрию, как и динуклеотид с интеркалированным лигандом. Оси симметрии C_2 в таком комплексе — это такие же оси, как и в комплексе ДНК с интеркалированным лигандом (см. структуру комплекса ДНК с этидием). Эти оси изображены на рис. 23.31,В, где представлена также структура комплекса ДНК с актиномицином, полученная путем экстраполяции данных для дезоксигуанозина.

Интересной особенностью определенной экспериментально структуры комплекса дезоксигуанозина с актиномицином D является образование специфических водородных связей между пептидными кольцами и двумя основаниями. Стерическое соответствие оказывается настолько хорошим, что возникает предположение о возможности предпочтительного связывания актиномицина D с такими последовательностями, как $\text{GrC} \cdot \text{GrC}$. Более детальное рассмотрение моделей связывания актиномицина D с ДНК было проведено на основе анализа более простого комплекса с этидием. В результате была получена структура, в которой нет оси точной симметрии второго порядка C_2 . Потеря симметрии происходит из-за собственной асимметрии феноксазонового кольца актиномицина и небольших, но заметных отклонений от симметрии двух полипептидных цепей.

Полученная модель (рис. 23.31,В) имеет ряд интересных особенностей. Как и в комплексе с этидием, конформации сахаров чередуются от C-3'-эндо к C-2'-эндо (направление 3' → 5'). Водородные связи между аминогруппами во 2-м положении гуанина и пептидными цепями (атомами кислорода треонина) имеют разную длину. В месте интеркаляции происходит излом молекулы ДНК, а с обеих сторон от места связывания образуются до-

полнительные изгибы вследствие стерических препятствий, создаваемых пептидными цепями. Суммарный поворот цепи составляет 40° . Угол раскручивания ДНК в результате связывания одной молекулы актиномицина должен быть равен 28° , что находится в хорошем согласии с экспериментальными данными. Пересмотренная модель объясняет, почему актиномицин не может связываться так же прочно с последовательностями типа $d(GpX)$ (где X соответствует G , A или T), как с последовательностями $d(GpC)$, у которых имеется ось симметрии C_2 .

ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМИ ЛИГАНДАМИ В РАСТВОРЕ

Комплексы между динуклеозидфосфатами и актиномицином D или этидием, образующиеся в растворе, изучались с помощью ЯМР и других физических методов, с тем чтобы выяснить, влияет ли на связывание последовательность оснований. Ранее мы отмечали, что спирали, образуемые комплементарными димерами, не очень стабильны в водных растворах, и поэтому их исследование оказывается нелегкой задачей. Однако, поскольку этидий и актиномицин D связываются преимущественно с двойной спиралью, они значительно увеличивают стабильность комплексов.

Различные дезоксирибодинуклеотиды связываются с актиномицином D совершенно по-разному. Первые исследования в этой области были основаны на регистрации изменений поглощения актиномицина D в полосе, лежащей в видимой области спектра, которые происходили при добавлении динуклеотидов (рис. 23.32, А). Из одних таких данных мож-

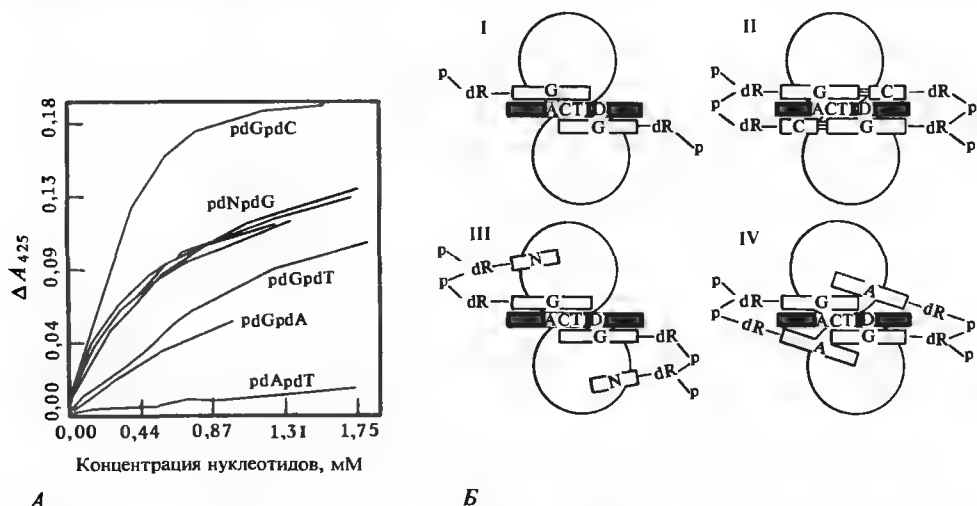


РИС. 23.32. Образование комплексов между актиномицином D и динуклеотидами. А. Изменение поглощения актиномицина, позволяющее следить за образованием комплексов по мере изменения концентрации добавленных динуклеотидов. Семейство кривых pdN — dG соответствует четырем обычным динуклеотидам, оканчивающимся dG , а также $5'$ - $dGMP$. Б. Схематическое изображение разных типов комплексов, модели которых построены на основании данных рис. А и по результатам некоторых других исследований. Когда G является $5'$ -нуклеотидом, образуемые комплексы оказываются наиболее стабильными, если может произойти спаривание оснований; если спаривание оснований невозможно, такие комплексы наименее стабильны из-за стерических препятствий. Когда G является $3'$ -нуклеотидом, комплексы оказываются сходными с мономерными. (Krugl T. R., Neely J. W., *Biochemistry*, 12, 4418, 1973.)

но получить только качественные оценки, поскольку достичь насыщения в изменении поглощения и, следовательно, определить константу связывания невозможно. Однако, если располагать дополнительными данными и предположить, что комплексы имеют стехиометрию 1:1 или 2:1, удастся определить различия в стабильности или стехиометрии комплексов, подгоняя экспериментальные данные под ожидаемую зависимость методом наименьших квадратов.

Было установлено, что $d(pGpC)$ образует прочный комплекс с актиномицином D со стехиометрией 2:1. Более того, этот комплекс образуется кооперативно, что указывает на возможное спаривание оснований двух цепей $d(pGpC)$ в комплексе. Комплексы всех других исследованных динуклеотидов имеют такую же конечную стехиометрию, но их образование носит некооперативный характер. Этот факт позволяет сделать вывод, что спаривания оснований не происходит даже в комплексах с самокомплементарными динуклеотидами типа $d(pCpG)$.

Константа связывания для последовательности $d(pCpG)$ (с поправкой на некооперативный характер связывания) оказывается приблизительно втрое меньше, чем для $d(pGpC)$. В действительности актиномицин D образует комплексы с $d(pCpG)$ не более стабильные, чем с несамокомплементарными димерами $d(pApG)$ и $d(pTpG)$. Исходя из этого для таких комплексов были построены гипотетические модели связывания, схематически изображенные на рис. 23.32,Б. Дальнейшие исследования методом ЯМР показали, что представления, на которых основаны эти модели, правильны; они подтвердили предположение, сделанное в результате исследования структуры комплекса актиномицина с дезоксигуанизином в кристалле и состоящее в том, что этот антибиотик может избирательно узнавать последовательности $d(pGpC)$ и $d(pCpN)$. В этих условиях действительно происходит интеркаляция лиганда (см. структуру II на рис. 23.32,Б).

Напротив, в случае последовательностей $d(pNpG)$ основания N контактируют сверху с гуанином, а не с феноксазоновым кольцом актиномицина D (см. структуру III на рис. 23.32,Б). По-видимому, контакт с одной стороной гуанина, ориентированной в направлении 3'-связанного сахара, для актиномицина D гораздо выгодней, чем с другой. Прямое указание на наличие такой специфичности было получено при исследовании связывания актиномицина D с синтетическими полинуклеотидами, имеющими регулярную периодическую последовательность.

Аналогичные исследования на олигонуклеотидах были выполнены для комплексов с этидием. Следить за образованием комплексов в этом случае можно по изменению флуоресценции и поглощения, а также спектров ЯМР. Результаты исследований методом ЯМР подтверждают, что и в растворе сахара принимают конформации C-3'-эндо (3' → 5') C-2'-эндо, характерные для большинства кристаллических комплексов с интеркаляцией лигандов. Полученные для растворов данные были неожиданными в одном отношении: оказалось, что комплексы с $UpA \cdot UpA$, $CpG \cdot CpG$ и $UpG \cdot CpA$ значительно стабильнее, чем комплексы с соответствующими изомерами, имеющими обратные последовательности. Тот факт, что в смеси некомплементарных динуклеозидфосфатов практически отсутствуют комплексы с этидием, указывает на необходимость образования в комплексах двойной спирали. Было показано, что этидий предпочтительно связывается с двухцепочечными последовательностями пиримидин(3' → 5')пурин. Эта специфичность, однако, не является абсолютной, и полученные данные носят качественный характер. Крайне важно тем не менее, что даже такая простая молекула, как этидий, способна узнавать некоторые специфические последовательности нуклеиновых кислот. Не удивительно, что белки, взаимодействующие с ДНК, обладают несравненно более высокой специфичностью, связываясь лишь со строго определенными последовательностями ДНК и РНК. Следует отметить, однако, что физическая природа специфичности взаимодействия этидия с нуклеиновыми кислотами еще не вполне ясна.

Исследования связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами ведутся очень интенсивно, и существует множество других интересных лигандов, комплексы которых пока изучены не столь полно, как для актиномина D и этидия. Обзоры полученных в этой области данных можно найти в литературе. Мы не будем здесь подводить итоги этим исследованиям, а вернемся к ним в следующей главе, когда будем говорить о кольцевых ДНК. Мы увидим, что лиганды сыграли ключевую роль в выяснении некоторых замечательных свойств природных и синтетических кольцевых ДНК.

Краткие выводы

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют предсказывать стабильность определенных вторичных структур РНК. Стабильность зависит от типов ближайших соседних пар оснований в двойной спирали, а также от размера и структуры одноцепочечных петель между спиральными областями. Термодинамические параметры, необходимые для таких оценок, можно определить, исследуя стабильность комплексов между короткими олигонуклеотидами, а также стабильность шпилек, образуемых синтетическими молекулами РНК. Экспериментальные данные для коротких спиралей очень хорошо описываются в рамках модели двух состояний. Использование этой модели существенно упрощает статистико-термодинамический анализ рассматриваемых систем. Результаты исследований множества модельных соединений позволяют сделать ряд общих выводов. Соседние GC-пары стабилизируют спиральные структуры в значительно большей степени, чем последовательности, содержащие AU-пары. Наименьшую дестабилизацию в структуру шпилек вносят петли, содержащие 6 или 7 оснований. Существование двух изолированных петель, разделенных лишь несколькими парами оснований, маловероятно. Последний вывод помогает понять кооперативность плавления ДНК.

Кинетические процессы, соответствующие конформационным изменениям в нуклеиновых кислотах, характеризуются широким диапазоном времен релаксации. Образование изолированных пар оснований и стэкинга оснований происходит за время порядка наносекунд. Короткие двойные спирали могут образовываться с константой скорости около $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. При этом быстро образуется неустойчивый зародыш спирали, а лимитирующей стадией является, по-видимому, образование второй или третьей пары; затем происходит быстрый рост спирали. Кинетика денатурации коротких спиралей оказывается очень быстрой и характеризуется высокой энергией активации. Напротив, кинетика плавления ДНК очень сложна и может быть очень медленной. Это связано с расплетанием частично денатурированной двойной спирали, которое лимитируется трением.

Кинетика образования зародышей спиральной области в коротких двойных спиралях оказывается очень удобной для изучения и анализа. Она является процессом второго порядка; его скорость зависит от размеров генома, к которому относится исследуемая ДНК, и от кратности повторов последовательностей в этом геноме.

Нуклеиновые кислоты взаимодействуют со многими низко- и высокомолекулярными лигандами. Для расчетов кривых связывания лигандов можно использовать матричный метод. Эта процедура позволяет легко учитывать кооперативность и антикооперативность связывания. Интеркалирующие лиганды, например этидий, связываются с ДНК с исключением соседних мест связывания (антикооперативно). Это приводит к удлинению спирали, вызывает ее раскручивание и может сопровождаться образованием изломов. При связывании, по-видимому, происходит изменение конформации сахаров в соседних нуклеозидах.

Задачи

23.1. Рассмотрите модель связывания лигандов с полинуклеотидом, в которой исключается связывание лигандов с соседними местами, но существует притяжение между связанными лигандами, если их разделяет одно свободное место. Обозначим через L занятое место связывания, а через E — свободное; тогда LELE, например, представляет последовательность из четырех мест, первое и третье из которых заняты лигандами.

а. Покажите, что статистические веса следующих конфигураций равны: $LEEE = k(m)$; $LLEE = 0$; $LELE = \zeta k^2(m)^2$.

б. Для вычисления кривой связывания лигандов необходимо рассмотреть заполнение двух соседних мест. Покажите, что вектор, описывающий начальное состояние, есть

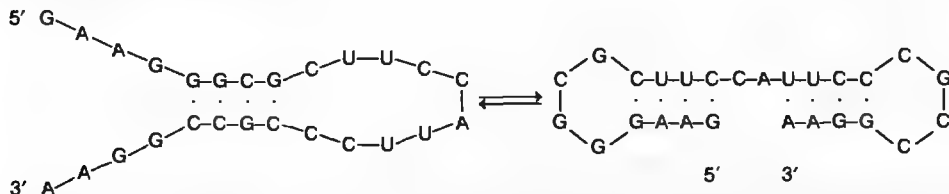
$$\begin{pmatrix} EE & LE & EL & LL \\ (1, & k(m), & k(m), & 0) \end{pmatrix}$$

в. Покажите, что матрица, необходимая для вычисления статистической суммы рассматриваемой системы, имеет вид

		Места 2 и 3			
		EE	LE	EL	LL
Места 1 и 2	EE	1	0	$k(m)$	0
	LE	1	0	$\zeta k(m)$	0
	EL	0	1	0	0
	LL	0	1	0	0

г. Найдите собственные числа матрицы, приведенной в п. в (сведите задачу к решению кубического уравнения). Покажите, что в пределе $\zeta = 1$ в этой модели (отсутствие кооперативности) кривая связывания, получаемая на основании уравнения (23.102), совпадает с кривой, полученной в тексте для модели с исключением мест связывания, описываемой уравнением (23.103).

23.2. Оцените константу равновесия при 25°C в 1 М растворе соли для следующего конформационного перехода:



23.3. Рассмотрим молекулы ДНК, которые состоят из регулярно чередующихся блоков по 300 пар оснований с одной и той же последовательностью С и по 300 пар с уникальными последовательностями $U_1, U_2, U_3, \dots$:



Пусть размер генома составляет $3 \cdot 10^6$ пар оснований. Постройте примерные кинетические кривые ренатурации, которые должны наблюдаться для фрагментов ДНК длиной по 60 пар оснований, 300, 600 и 1800 пар.

23.4. Две молекулы тРНК с комплементарными антикодонами образуют в 10^6 раз более стабильные комплексы, чем следует из данных для олигонуклеотидов, приведенных в табл. 23.4 и 23.5. Подумайте, какие факторы могут способствовать этой дополнительной стабилизации, и предложите эксперименты с модельными соединениями, которые позволили бы проверить влияния каждого из этих факторов.

23.5. Пусть имеется гипотетический набор данных относительно суммарной концентрации цепей, при которой T_m при концентрации соли 1 М составляет 37°C : ААТАА · ТТАТТ, 0,031 М; АТАТА · ТАТАТ, 0,010 М; ААААТ · АТТТТ, 0,120 М. Значение ΔG^0 для нуклеации АТ-пары (при концентрации цепей 1 М в 1 М растворе соли) составляет 4 ккал · моль⁻¹. Используя модель двух состояний, найдите ΔG для образования комплекса ТАААА · ТТТТА при концентрации цепей 1 М, 37°C и концентрации соли 1 М.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr.*, 1974. Physical Chemistry of Nucleic Acids, New York. Harper and Row.
- Riesner D., Römer R.*, 1973. Thermodynamics and kinetics of conformational transitions in oligonucleotides and tRNA. In: Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids, vol. 2, ed. J. Duchesne, London, Academic Press, p. 237.
- Ts'o P.O.P.*, 1974. Dinucleoside monophosphates, dinucleotides and oligonucleotides. In: Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, vol. 2, ed. P.O.P. Ts'o, New York, Academic Press, p. 305.

Специальная

- Craig M. E., Crothers D. M., Doty P.*, 1971. Relaxation kinetics of dimer formation by self-complementary oligonucleotides, J. Mol. Biol., 62, 383.
- Dewey T. G., Turner D. H.*, 1979. Laser temperature-jump study of stacking in adenylic acid polymers, Biochemistry, 18, 5757.
- Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B.*, 1975. Molecular Biology of Eucaryotic Cells, Menlo Park, Calif., Benjamin.
- Krugh T. R., Mooberry E. S., Chiao Y. C. C.*, 1977. Proton magnetic resonance studies of actinomycin D complexes with mixtures of nucleotides as models for the binding of the drug to DNA, Biochemistry, 16, 740, 747.
- Lee C. S., Davis R. W., Davidson N.*, 1970. A physical study by electron microscopy of the terminally repetitive circularly permuted DNA from the coliphage particles of *Escherichia coli* 15, J. Mol. Biol., 48, 1. [Исследуется миграция одноцепочечных боковых петель.]
- Patel D. J., Shen C.*, 1978. Sugar pucker geometries of the intercalation site of propidium diiodide into miniature RNA and DNA duplexes in solution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2553.
- Record M. T., Zimm B. H.*, 1972. Kinetics of the helix — coil transition in DNA, Biopolymers, 11, 1435.
- Scheffler I. E., Elson E. C., Baldwin R. L.*, 1968. Helix formation by dAT oligomers, I: Hairpin and straight chain helices, J. Mol. Biol., 36, 291. [См. также следующую статью и работы J. Mol. Biol., 54, 401 (1970).]
- Thompson B. J., Camien M. N., Warner R. C.*, 1976. Kinetics of branch migration in double-stranded DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2299.
- Wetmur J. G., Davidson N.*, 1968. Kinetics of renaturation of DNA, J. Mol. Biol., 31, 349.

Глава 24 Третичная структура нуклеиновых кислот

24.1. Кольцевая ДНК

Под третичной структурой нуклеиновых кислот понимают возможные изломы и сверхспирализацию в линейных двойных спиральных, спиральные участки и петли, образуемые одиночными цепями, и топологические образования в кольцевой ДНК (такие, как узлы, сверхвитки и катенаны). В этой главе в центре нашего внимания будут кольцевая ДНК и тРНК. Везде, где только можно, мы будем проводить сопоставление различных методов, позволяющих нам получить сведения о третичной структуре нуклеиновых кислот в растворе.

Фактически во всех ранних биофизических исследованиях ДНК имели дело с относительно короткими линейными молекулами. Авторадиографический анализ показал, что некоторые бактериальные ДНК замкнуты в кольцо, но препараты таких молекул удалось получить только после того, как были разработаны очень мягкие процедуры выделения, позволяющие избежать разрыва молекул за счет механической или ферментативной деградации. Впервые кольцевая ДНК в растворе была обнаружена при работе с бактериофагом ϕ X174. Нуклеотидный состав этой ДНК был необычен тем, что $\chi_A \neq \chi_T$, а $\chi_G \neq \chi_C$. Кроме того, она оказалась устойчивой к расщеплению экзонуклеазами. Из этой устойчивости следовало, что ДНК фага ϕ X174 представляет собой одноцепочечную кольцевую молекулу, и действительно, при электронно-микроскопическом исследовании препаратов этой ДНК, обработанной формальдегидом (чтобы устранить всякую внутримолекулярную вторичную структуру), увидели кольцевые молекулы.

При последующей работе с *E. coli*, инфицированной бактериофагом ϕ X174, обнаружили еще одну форму ДНК ϕ X174. Этой форме отвечают обычные для ДНК значения отношений, характеризующих нуклеотидный состав (выполняются правила Чаргаффа), и она тоже имеет вид кольца под электронным микроскопом. В препаратах, приготовленных по методу Кляйншмидта для электронного микроскопа, одно- и двухцепочечную ДНК можно отличить друг от друга (пленка цитохрома c, обволакивающая двухцепочечную ДНК, кажется чуть толще, к тому же двухцепочечная молекула имеет не столь изломанный контур). Такие исследования позволили сделать вывод, что эта вторая форма ДНК ϕ X174 (репликативная форма) представляет собой двухцепочечную кольцевую молекулу.

ЛИНЕЙНАЯ И КОЛЬЦЕВАЯ ФОРМЫ ДНК ФАГА λ

Кольцевую ДНК другого рода впервые обнаружили у бактериофага λ . При исследовании ДНК фага λ на ультрацентрифуге оказалось, что она представлена набором компонентов с различными коэффициентами седиментации. Если выделить один из компонентов при помощи зонального центрифугирования и оставить его в покое на некоторое время, он медленно перейдет в равновесную смесь компонентов. Использование ферментов, а также исследования с помощью электронного микроскопа показали, что два наиболее медленно седиментирующие компонента, 21S- и 24S-компоненты, представляют собой соответственно двухцепочечную линейную и двухцепочечную кольцевую формы молекулы. Более «быстрые» компоненты являются n -мерами этих последних, например линейными или кольцевыми двухцепочечными молекулами двойной длины. Чтобы объяснить способность ДНК фага λ претерпевать все эти взаимные превращения, было высказано

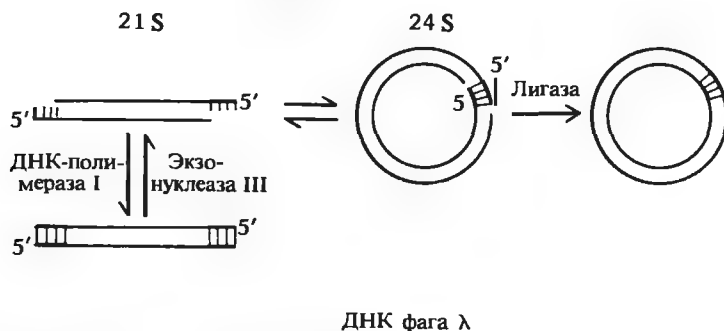


РИС. 24.1. Некоторые формы ДНК бактериофага λ .

предположение о том, что данная ДНК имеет короткие одноцепочечные комплементарные концы (рис. 24.1). Эта гипотеза была подтверждена ферментативными тестами. В присутствии дезоксирибонуклеозидтрифосфатов ДНК-полимераза I из *E. coli* способна удлинять свободный 3'-конец, пользуясь комплементарной цепью как матрицей. Обработка ДНК-полимеразой I превращает линейную 21S-форму ДНК фага λ в молекулу с точно такими же свойствами, за исключением того, что она больше не переходит обратно в другие формы. Кроме того, в результате обработки кольцевой 24S-формы ДНК-лигазой получается кольцевая двойная спираль, не содержащая разрывов в одиночных цепях. Поэтому она не может переходить обратно в линейные формы и находится с ними в термодинамическом равновесии.

Длину одноцепочечных концов в ДНК фага λ можно оценить, изучая равновесие между 21S- и 24S-формами при достаточно малых концентрациях последних, чтобы не допустить образования n -меров более высокого порядка. Чтобы найти константу равновесия в реакции образования колец, нужно знать долю кольцевой (χ_K) и линейной форм: $K_K = \chi_K / (1 - \chi_K)$. Измерив зависимость K_K от температуры и построив график в аррениусовских координатах, получаем кажущуюся энтальпию образования колец, равную -90 ккал·моль $^{-1}$. Разумно предположить, что почти все это изменение энтальпии происходит за счет теплоты образования дополнительных пар оснований между одноцепочечными концами двойной цепи. Двухцепочечная ДНК, длина которой равна длине молекулы ДНК фага λ , обладает достаточной гибкостью, поэтому сгибание ее в кольцо не должно привести к существенному изменению энтальпии. Воспользовавшись средним значением для энтальпии образования пары оснований, равным -8 ккал·моль $^{-1}$, получим, что длина дополнительного спирального участка должна составлять примерно 11 пар оснований. Последующие работы по определению нуклеотидной последовательности показали, что фактическая длина одноцепочечного конца ДНК фага λ равна 12 парам оснований, что неплохо согласуется с предыдущей оценкой, полученной на основе термодинамических расчетов.

Свободную энергию образования двенадцати пар оснований можно приблизительно¹ оценить с помощью табл. 23.4, что дает примерно -36 ккал·моль $^{-1}$ при 25°C. При любой разумной концентрации в растворе два свободных комплементарных додекануклеотида будут существовать почти исключительно в форме комплекса. Однако после того, как ДНК фага λ замкнется в кольцо, число возможных конформаций ДНК очень сильно уменьшится. Это приведет к значительному уменьшению энтропии; величина эффекта до-

¹ В табл. 23.4 приведены данные для РНК, однако для ДНК результаты должны быть качественно такими же.

лжна быть пропорциональна логарифму контурной длины ДНК, возведенной в степень $-3/2$ (гл. 23). Энтропия циклизации почти компенсирует благоприятное изменение свободной энергии Гиббса при образовании пар между одноцепочечными концами. Чем больше молекула, тем длиннее должны быть одноцепочечные концы, чтобы могла существовать заметная доля кольцевых молекул. Для очень коротких молекул (скажем, менее 500 пар оснований) двойная спираль ДНК уже не является достаточно гибкой, и образование кольцевой формы требует дополнительных энергетических затрат на сгибание или деформацию молекулы.

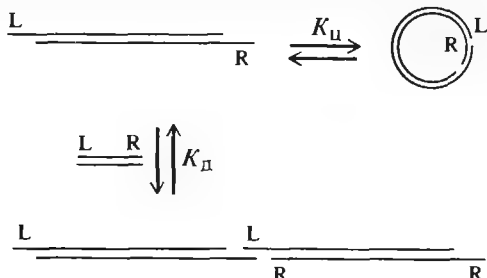
Можно представить себе, что кинетика образования λ -кольца из линейной формы проходит в два этапа. Оба конца цепи должны сблизиться друг с другом посредством диффузии, лишь тогда становится возможным возникновение зародыша двойной спирали и схлопывание остальных пар в этом вновь образуемом спиральном участке. Дж. Уонг (J. Wang) и Н. Дэвидсон (N. Davidson) изучали зависимость скорости образования λ -кольца, которая представляет собой реакцию первого порядка, от температуры и вязкости, с тем чтобы узнать, какая из этих двух стадий является лимитирующей. Если скорость реакции лимитируется диффузией, то она будет пропорциональна коэффициенту диффузии реагирующих элементов, т.е. $k \propto T/\eta$. Изучая модельные системы, установили, что скорость образования зародыша двойной спирали из близко расположенных одиночных цепей определяется образованием первых двух или трех пар оснований (гл. 23). При этом может наблюдаться заметная отрицательная или положительная кажущаяся энергия активации и не должно быть никакой зависимости от вязкости.

Опытным путем установлено, что циклизация характеризуется большой положительной кажущейся энергией активации и что $k\eta/T$ заметно растет с температурой. Отсюда следует однозначный вывод, что именно образование двойной спирали, а не диффузия, лимитирует скорость реакции. Это лишний раз показывает, что молекулярные движения (в данном случае сближение двух концов длинной цепи), которые мы могли бы интуитивно считать весьма замедленными, на самом деле происходят с заметной скоростью в масштабах лабораторного и биологического времен.

Дополнение 24.1

КОНКУРЕНЦИЯ МЕЖДУ ЦИКЛИЗАЦИЕЙ И МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЙ АССОЦИАЦИЕЙ ДНК

Любая ДНК с комплементарными одноцепочечными концами, например ДНК бактериофага λ , способна замыкаться в кольцо или ассоциировать сама с собой, образуя n -мерные линейные или кольцевые формы. Соотношение между этими формами будет зависеть от длины молекулы ДНК и от концентрации ДНК в растворе. Здесь мы рассмотрим только простейший случай конкурентного образования линейных димеров и кольцевых мономеров из линейных мономеров (см. рисунок).



Реакция димеризации, характеризуемая константой равновесия K_D , заключается в образовании комплекса между левым концом (L) одной молекулы и правым концом (R) другой. Для такой реакции мы можем написать

$$2K_D = (\text{Димер})/(\text{Мономер})^2,$$

поскольку момеры могут образовывать один и тот же димер двумя способами.

Выразим формально константу равновесия в реакции циклизации:

$$K_{\text{Ц}} = (\text{Кольцевая форма})/(\text{Линейная форма})$$

Мы можем связать K_D и $K_{\text{Ц}}$, имея в виду, что локальная реакция в обоих случаях фактически одна и та же, но мономолекулярная реакция зависит от концентрации одного конца молекулы в окрестности другого. Обозначив эту концентрацию через j , мы можем написать

$$K_{\text{Ц}} = K_D j$$

Чтобы вычислить внутримолекулярную концентрацию j одного из концов молекулы в окрестности другого, воспользуемся уравнением (23.41), из которого следует, что (в случае гибких молекул) доля молекул, у которых оба конца расположены внутри объема V_i , равна

$$\Omega' / \Omega = (3/2\pi l N)^3 {}^2 V_i$$

где N — число сегментов, а l — длина одного сегмента. Так как V_i имеет размерность объема, для концентрации j получаем

$$j = (3/2\pi l N)^{3/2} \text{ молекул} \cdot \text{см}^{-3}$$

Параметры l и N представляют собой статистические длину сегмента и число сегментов, и их точные значения определяются свойствами молекул данного полимера. Однако в случае двойной спирали ДНК без особенностей l — величина постоянная, а число сегментов N пропорционально молекулярной массе. Для ДНК фага λ , молекулярная масса которой равна $30,8 \cdot 10^6$, найденная опытным путем величина j составляет $3,5 \cdot 10^{11} \text{ концы} \cdot \text{см}^{-3} = 5,8 \cdot 10^{-10} \text{ М}$. Для произвольной ДНК молекулярной массы M мы можем тогда написать

$$j = 5,8 \cdot 10^{-10} (30,8 \cdot 10^6 / M)^{3/2} = 99 / M^{3/2}$$

Из первых трех равенств получаем отношение концентраций кольцевых и димерных линейных молекул

$$(\text{Кольцевая форма})/(\text{Димер}) = j/2(\text{Линейная форма})$$

Выражая концентрацию мономерной линейной ДНК в молях нуклеотидных остатков на литр (C), имеем

$$(\text{Линейная форма}) = 330 C / M$$

Подставив соответствующие выражения вместо j и (Линейная форма), мы можем окончательно написать

$$(\text{Кольцевая форма})/(\text{Димер}) = 0,15 M^{-1/2} / C$$

В случае гомогенных по молекулярной массе препаратов ДНК это конечное соотношение показывает, какое нам следует выбрать значение полной концентрации линейной ДНК, чтобы образовались преимущественно кольцевые молекулы или димеры. Этот вывод имеет громадное практическое значение при конструировании рекомбинантных ДНК *in vitro*. В этом случае обыкновенно цель состоит в том, чтобы сдвинуть равновесие в сторону образования межмолекулярных комплексов между молекулами векторной ДНК и ДНК мишени, сведя при этом к минимуму нежелательное явление образования кольцевых молекул или n -меров более высокого порядка. Более подробно о реакции образования кольцевых молекул см. работу Wang, Davidson, 1966; примеры практического использования рассмотренного нами случая приведены в работе Dugaiczuk et al., 1975.

Процессы образования кольцевой ДНК занимают очень важное место в репликации *in vivo* ряда вирусов и в различных методах получения рекомбинантных ДНК *in vitro*. В Дополнении 24.1 показано, в какой мере способность ДНК к образованию кольцевой формы зависит от длины и концентрации молекул.

ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ В КОЛЬЦЕВОЙ ЗАМКНУТОЙ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

В природе найдено уже большое число кольцевых ДНК; к ним относятся многие ДНК животного происхождения, а также бактериальные и вирусные, плазмидные и митохондриальные ДНК. Большинство из них не являются одноцепочечными (как ДНК ф ϕ X174), не имеют разрывов в одиночных цепях и неспособны находиться в равновесии с линейными формами (как ДНК фага λ). Напротив, они представляют собой кольцевые двухцепочечные ДНК с совершенно целыми цепями. Такие структуры называют замкнутыми кольцевыми двухцепочечными; всякую кольцевую форму с одним разрывом или более в одиночных цепях называют открытой кольцевой двухцепочечной формой. Замкнутую и открытую структуры нетрудно различить опытным путем (рис. 24.2). Допустим, что мы поместили нашу ДНК в щелочной раствор. В любой открытой структуре при высоком значении pH связи между цепями ДНК разорвутся. Даже при наличии одного разрыва в одной из цепей концы последней смогут вращаться относительно другой цепи, и в результате эти две одиночные цепи разойдутся. При центрифугировании в щелочном растворе кольцевой двухцепочечной молекулы с разрывом в одной из цепей мы обнаружим линейную цепь и одноцепочечное кольцо. При высоком значении pH может произойти разрыв водородных связей между основаниями и в замкнутой двойной спирали, но в этом случае два образовавшихся одноцепочечных кольца не смогут разделиться. Действительно, как мы увидим далее, они остаются настолько переплетенными, что образуется клубок из спутанных одиночных цепей ДНК. Такой весьма компактной структуре отвечает большой коэффициент седиментации, и ее легко отличить от любых свободных одноцепочечных форм.

Коллапс структуры кольцевой замкнутой двойной спирали при щелочных pH происходит из-за наличия в последней топологических ограничений. Ими же обусловлены замечательные свойства замкнутых кольцевых форм, которые служат главной темой настоящего раздела. Покажем сначала, почему две цепи замкнутой двухцепочечной молекулы не могут разойтись. Очевидно, что два кольца, сцепленные друг с другом, нельзя разделить,

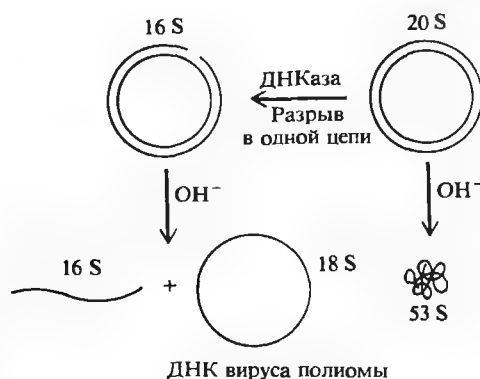


РИС. 24.2. Некоторые формы ДНК вируса полиомы. Обратите внимание на огромную разницу в эффектах, вызываемых действием щелочи на замкнутую и на открытую кольцевые формы.

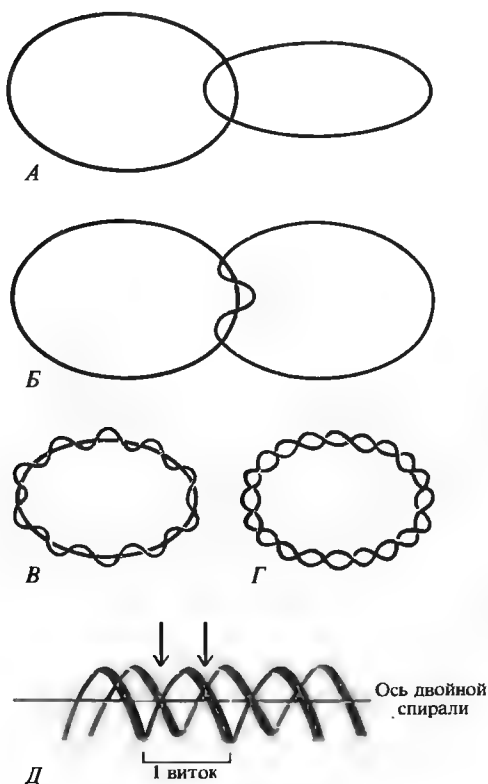


РИС. 24.3. Топологические свойства контуров, находящихся в зацеплении друг с другом. *А.* Кольца, переплетающиеся друг с другом однократно. *Б.* Контур, переплетающийся дважды. *В.* Контур с десятью переплетениями. *Г.* Кольцевая замкнутая двойная спираль из десяти витков. Эта структура и структура, изображенная в части *В* рисунка, топологически эквивалентны. *Д.* Увеличенное изображение участка двойной спирали. Как можно видеть, на каждый виток приходится два пересечения проекций цепей. Из частей *А* и *Б* рисунка очевидно, что каждая пара пересечений эквивалентна однократному переплетению цепей друг с другом. [Части *А—Г* рисунка заимствованы из работы Bauer, Vinograd (1974).]

если не разорвать одно из них. В результате взаимного переплетения контуров — однократного или многократного — всегда получаются неразделимые структуры (рис. 24.3, *А*). В топологическом отношении кольцевая замкнутая ДНК эквивалентна двум контурам, переплетенным друг с другом столько раз, сколько витков в двойной спирали.

Допустим для наглядности, что простые контуры, находящиеся в зацеплении, расположены так, что один из них целиком лежит в плоскости. Порядок зацепления α равен по определению алгебраическому числу пересечений одним контуром поверхности, натянутой на другой контур. На рис. 24.3, *А—В* показано, что α равен также половине числа кажущихся пересечений двух контуров друг с другом, если смотреть на них в направлении, перпендикулярном плоскости, в которой лежит один из них. Теперь рассмотрим двойную спираль, в которой имеется β витков (рис. 24.3, *Г*). Допустим, что одна цепь уже расположена надлежащим образом, и проследим за тем, что происходит, когда мы навиваем вторую цепь на первую так, что образуется двойная спираль. С каждым витком спирали вторая цепь должна проходить сквозь кольцо, образованное первой цепью. При этом получается одно зацепление на один виток. Можно подойти к этому по-иному. Рассмотрим участок двойной спирали, изображенный на рис. 24.3, *Д*. С каждым витком спирали проекции двух ее цепей на любую плоскость, параллельную оси спирального участка, пересекаются дважды. Используя любой из этих подходов, нетрудно видеть, что в случае лежащей на плоскости замкнутой кольцевой двойной спирали, в которой имеется β спиральных витков, $\alpha = \beta$.

Теперь становится понятно, почему в щелочной среде не может произойти разделения цепей высокомолекулярных кольцевых замкнутых двухцепочечных ДНК. Когда порядок зацепления выражается в тысячах, всякая попытка освободить одну цепь от другой приведет к образованию запутанного клубка. Порядок зацепления для любой замкнутой двойной цепи — величина постоянная. Ее можно изменить, лишь разорвав одну из двух кольцевых цепей.

СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИЯ В КОЛЬЦЕВЫХ ЗАМКНУТЫХ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ МОЛЕКУЛАХ

Помимо витков двойной спирали, т.е. витков вторичной структуры, кольцевой замкнутый комплекс из двух цепей может включать витки третичной структуры, входящие в число так называемых витков сверхспирализации, или сверхвитков, которые мы определим ниже. Чтобы понять, что это означает, давайте внимательно проследим за ходом мысленного эксперимента, иллюстрацией к которому служит рис. 24.4, А. Витки в структуре двойной спирали ДНК закручены вправо. Это означает, что в каком бы направлении вы ни следовали вдоль цепей двойной спирали, цепи сообщают удаляющейся точке вращение по часовой стрелке. Предположим, что мы взяли линейную двухцепочечную ДНК с числом витков, равным β , и расплели один виток. Если мы замкнем ДНК в кольцо, то это будет кольцевая молекула, в которой один из витков вторичной структуры оказывается расплетенным, и порядок зацепления теперь равен $\beta - 1$. Можно поступить по-другому. Допустим, что мы крепко зажали концы линейной ДНК и повернули один из зажимов по часовой стрелке на один оборот, не расплетая витков вторичной структуры. Такая ДНК свернется в петлю. Это происходит ввиду наличия топологических ограничений, которые возникли из-за того, что мы зажали концы ДНК; когда кисти ваших рук поворачиваются, стремясь раскрутить спираль ДНК, она отвечает тем, что сворачивается в петлю, следуя направлению вращения зажимов. (Читателю, который в этом сомневается, мы рекомендуем проделать этот опыт с куском бельевой веревки или резинового шланга.) Если мы соединим теперь концы ДНК, не давая ей при этом раскручиваться, и образуем из нее кольцевую форму, то в результате получим замкнутую двойную спираль с порядком зацепления $\beta - 1$.

Рассуждая таким образом, мы видим, что две формы ДНК, изображенные на рис. 24.4, А, имеют один и тот же порядок зацепления, и поэтому их можно переводить друг в друга, не разрывая цепей. Реальная ДНК в такой ситуации может существовать как равновесная смесь этих двух форм и многих других с таким же порядком зацепления. Основная задача, которая стоит перед биофизиком, состоит в том, чтобы определить, какие формы термодинамически выгодны, а затем попытаться объяснить это наблюдение.

Результаты гипотетического эксперимента, изображенного на рис. 24.4, А, являются следствием топологической теоремы, связывающей порядок зацепления α с числом витков вторичной структуры β и величиной так называемого райзинга W , зависящей лишь от формы оси двойной спирали:

$$\alpha = \beta + W \quad (24.1)$$

Более строгое и общее определение величин, фигурирующих в уравнении (24.1), приводится в Дополнении 24.2.

Поскольку α есть топологический инвариант для любой кольцевой замкнутой двухцепочечной ДНК, любое изменение β должно сопровождаться компенсирующим изменением W . Виток, изображенный на рис. 24.4, А, называют тороидальным. Молекула, в которой много таких витков, будет походить на бублик, или тор, как показано на рис. 24.4, Б. Знак образуемой спирали можно определить с помощью оси, расположенной в плоскости

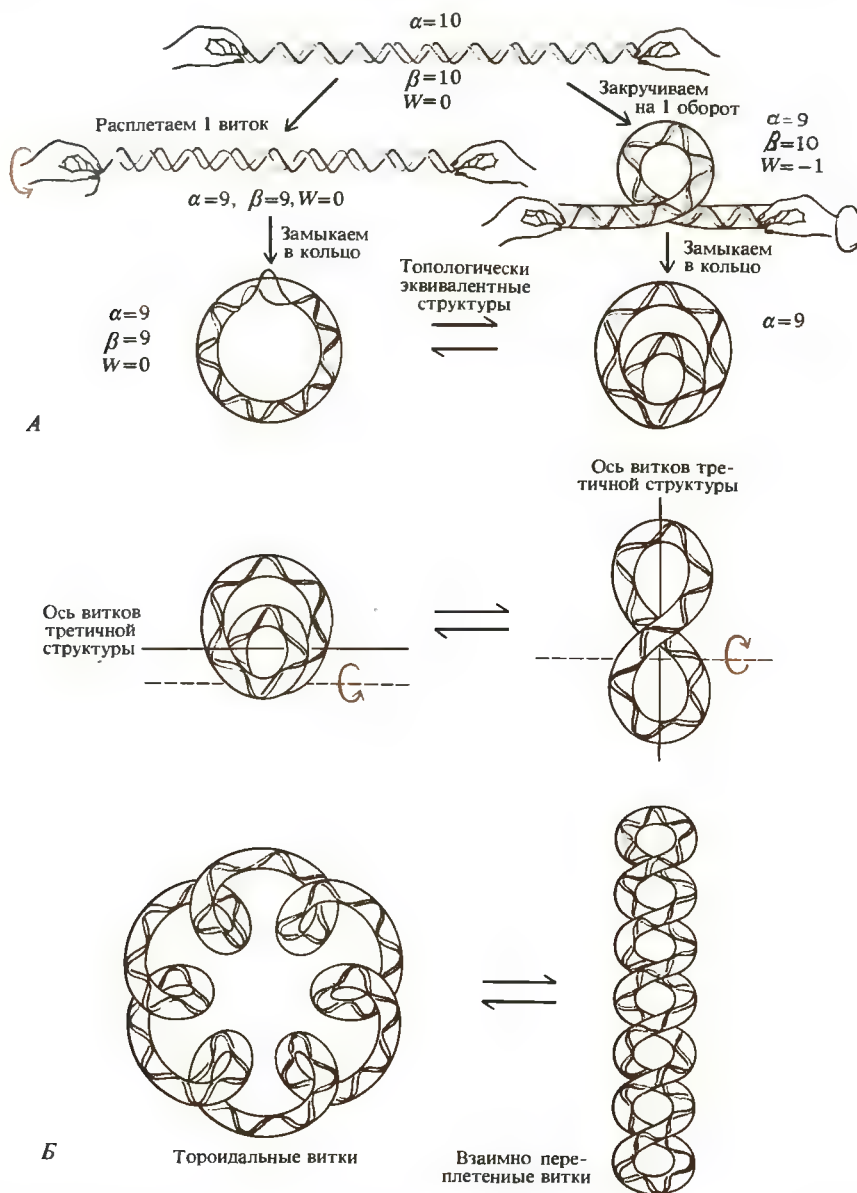


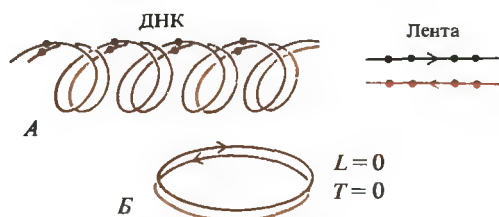
РИС. 24.4. Сверхспирализация ДНК. А. Схематическое изображение двух способов образования одного сверхвитка в ДНК, имеющей 10 витков во вторичной структуре. Порядок зацепления α , число витков вторичной структуры β и райзинг W определены в тексте. В случае правой спирали α и β положительны. Для правых тороидальных витков $W > 0$, для правых взаимно переплетенных сверхвитков $W < 0$. Б. Переход тороидальных и взаимно переплетенных витков друг в друга. Закрученный влево тороидальный виток получается из правого переплетенного витка путем простого перегибания (по штриховой линии). Труднее представить себе, как происходит переход между формами с большим числом витков. Важно подчеркнуть, что W изображенных структур меньше по абсолютной величине числа видимых на рисунке тороидальных или взаимно переплетенных витков третичной структуры.

Дополнение 24.2

ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЬЦЕВЫХ ЗАМКНУТЫХ ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ

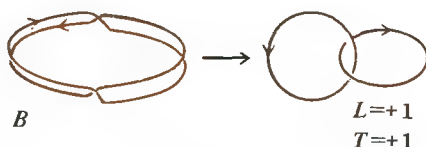
В основном тексте, для того чтобы описать различные типы топологии двойных спиралей, мы ввели три параметра: порядок зацепления α , число спиральных витков β и райзинг W . Здесь мы попытаемся дать более общее описание топологии кольцевых двойных спиралей. Подход, которому мы будем следовать, развит Фуллером (Fuller, 1971); его применимость для случая ДНК была рассмотрена Криком (Crick, 1976).

Чтобы мы могли сконцентрировать все внимание на общей топологии ДНК, представим обычную двойную спираль в В-форме в виде плоской ленты, один край которой образован линией, проходящей через каждый десятый фосфат одной цепи, а другой край — линией, проходящей через каждый десятый фосфат другой цепи (рис. А). Края ленты помечены стрелками или отличаются друг от друга цветом, чтобы обозначить взаимно противоположную направленность двух цепей ДНК. Тогда кольцевая замкнутая ДНК, цепи которой образуют на всем протяжении спираль в В-форме, в отсутствие сверхспирализации моделируется замкнутой лентой, изображенной на рис. Б.



ПОРЯДОК ЗАЦЕПЛЕНИЯ

Порядок зацепления L ленты определяется как число зацеплений в пространстве двух ее краев (рассматриваемых как отдельные замкнутые линии). Например, для перекрученной ленты, изображенной на рис. В, порядок зацепления равен $+1$. Знак «плюс» берется потому, что направление закручивания отвечает типу правой спирали (по часовой стрелке). Зеркальное отображение этой структуры имело бы порядок зацепления, равный -1 ; и вообще, в результате зеркального отражения знак L всегда меняется на противоположный. Порядок зацепления замкнутой ленты есть величина постоянная (т.е. топологический инвариант): он не может измениться, пока вы не разрежете или не разорвете ленту.



Заметим, что представляя ДНК в виде плоской ленты, мы игнорируем все зацепления, которые возникают из-за взаимного переплетения двух цепей самой двойной спирали. Связь между L и α такова:

$$L = \alpha - \beta_0$$

где β_0 — число витков двойной спирали, которое должна иметь та же ДНК при условии, что ее вторичная структура не напряжена и представляет собой двойную спираль в В-форме.

Порядок зацепления замкнутой ленты всегда должен быть целым числом. Это целое число L можно определить для любой замкнутой ленты очень просто. Посмотрим на ленту с некоторого расстояния и заметим, сколько раз цветная линия перекрещивается с черной, оказываясь *над* ней (или наоборот, но только не то и другое вместе). Поставим в соответствие каждому такому пересечению число $+1$, если лента в области пересечения закручена вправо, и -1 , если направление закручивания отвечает левой спирали. Сложив далее эти числа, мы и получим L . В случае, изображенном на рис. В, подсчитав, сколько раз черная линия проходит над цветной, мы получим 3 перехода: 2 слева направо и 1 справа налево. Таким образом, $L = 2 - 1 = +1$. Если мы будем считать, сколько раз цветная линия проходит над черной, то увидим только одно пересечение, которое отвечает переходу слева направо, так что опять $L = +1$

КРУЧЕНИЕ

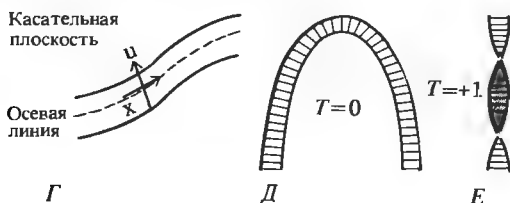
Кручение — еще одна характеристика ленты. Чтобы определить этот параметр, проведем осевую линию, проходящую по поверхности ленты и равноудаленную от ее краев. Для любой точки осевой линии определим $\mathbf{x}$ как вектор, направленный по касательной к этой линии в данной точке. Пусть другой единичный вектор $\mathbf{u}$ перпендикулярен $\mathbf{x}$ и задает прямую, пересекающую оба края ленты (рис. Г). Величина кручения определяется величиной угла поворота $\mathbf{u}$ относительно $\mathbf{x}$ при движении вдоль ленты. Полное кручение T есть результат интегрирования угла закручивания на всем протяжении ленты, деленный на 2π . Если через ω мы обозначим угловую скорость (на единицу длины осевой линии) поворота вектора $\mathbf{u}$ относительно $\mathbf{x}$, а через ds — приращение длины этой линии, то T будет представлять собой контурный интеграл:

$$T = (1/2\pi) \oint \omega ds$$

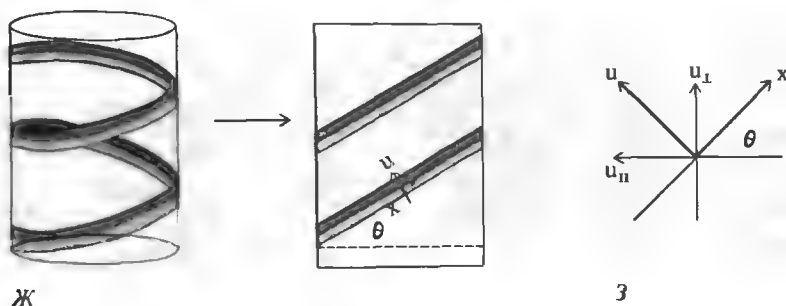
Кручение не обязательно должно выражаться целым числом и может быть определено как для открытых, так и для замкнутых полос. При зеркальном отражении знак полного кручения изменяется на противоположный. Для модели ДНК, представленной плоской лентой, полное кручение связано с числом спиральных витков β соотношением

$$T = \beta - \beta_0$$

Ленту можно согнуть не закручивая (рис. Д) или перекрутить не сгибая (рис. Е). Отметим также, что в случае, изображенном на рис. В, $T = 0$, а для структуры рис. В $T = +1$. Кручение можно вычислять отдельно для разных участков ленты. Тогда полное кручение равно сумме кручений всех участков (L нельзя вычислить подобным образом).



Для моделирования разных типов сверхспирализации бывает удобно рассматривать ленту, часть которой одной стороной прилегает к боковой поверхности цилиндра, образуя спираль из N витков при постоянном значении угла подъема винтовой линии θ . Спираль мы можем спроецировать на боковую поверхность цилиндра, а цилиндр развернуть в плоский лист (рис. Ж). На развертке цилиндра вектор $\mathbf{u}$ совсем не поворачивается вокруг вектора $\mathbf{x}$. Поэтому, чтобы вычислить T , нам нужно только подсчитать, сколько раз $\mathbf{u}$ повернется вокруг $\mathbf{x}$, когда мы свертываем лист опять в цилиндр, чтобы получить спираль. Это легче сделать, разложив $\mathbf{u}$ на две составляющие, параллельную ($\mathbf{u}_{\parallel}$) и перпендикулярную ($\mathbf{u}_{\perp}$) оси цилиндра (рис. З).



Свертывание листа в цилиндр никак не влияет на $u_{||}$, а $u_{\perp}$ с каждым витком спирали поворачивается вокруг оси цилиндра на 360° . Можно показать, что число оборотов, совершаемых вектором u вокруг x за один виток спирали, численно равно его проекции на ось $u_{\perp}$, что составляет $\cos(90^\circ - \theta) = \sin \theta$. Таким образом, для спирали, состоящей из N витков, полное кручение выражается формулой

$$T = N \sin \theta$$

РАЙЗИНГ ¹

Фуллер определяет райзинг W ленты как

$$W = L - T$$

Так как L и T изменяют свой знак на противоположный при зеркальном отражении, то и W должен вести себя точно так же. Оказывается, райзинг имеет ряд интересных свойств. Его величина целиком определяется траекторией оси ленты в пространстве. Таким образом, для данной замкнутой кривой, как бы мы ни располагали вдоль нее ленту, мы получим один и тот же райзинг. Грубо говоря, W является мерой асимметрии и искривленности осевой линии в пространстве. Для любой замкнутой кривой, целиком лежащей в плоскости или на поверхности шара, W равен нулю. Для ленты с такой осевой линией нетрудно найти кручение, если воспользоваться сформулированным ранее простым правилом, позволяющим определить порядок зацепления, и учитывая, что в этом случае $T = L$.

Для двойной спирали ДНК, воспользовавшись приведенными ранее равенствами, мы можем на-

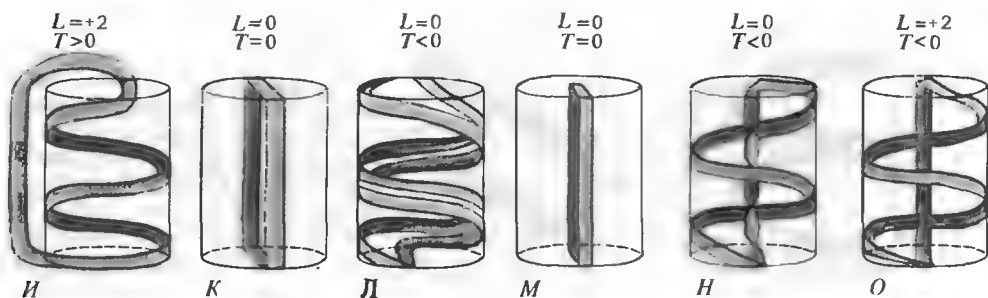
$$W = \alpha - \beta$$

что совпадает с равенством (24.1).

НЕСКОЛЬКО ПРИМЕРОВ, ИЛЛЮСТРИРУЮЩИХ СМЫСЛ ПАРАМЕТРОВ W , L И T

Рассмотрим шесть примеров, в которых замкнутая лента обвивается вокруг цилиндра. На рис. *И* изображен аналог тороидальной сверхскрученной молекулы. Лента описывает вокруг цилиндра два полных витка по спирали и замыкается участком с нулевым кручением. Черный край переходит через линию цветного края дважды, и в обоих случаях переход происходит слева направо, т.е. $L = +2$. Кручение равно $2 \sin \theta$; таким образом, $W = 2(1 - \sin \theta)$. Другими словами, райзинг будет определяться углом подъема винтовой линии θ .

¹ Термин происходит от английского writhing number, буквально: число извивов; writhing — слово, производное от глагола to writhe, что значит «извиваться, скрутить, перекрутить». — Прим. перев.



В случае, изображенном на рис. *К*, очевидно, $L = 0$ и $T = 0$. Фигура *Л* получается из фигуры *К*, если закрепить неподвижно нижнее основание цилиндра и повернуть верхнее основание на 720° (т.е. сделать два полных оборота) по часовой стрелке. В результате такого закручивания L не может измениться, т.е. останется равным нулю. Для каждой из этих двухвитковых левых спиралей $T = -2 \sin \theta$, так что полное кручение равно $-4 \sin \theta$, т.е. $W = +4 \sin \theta$.

В случае, изображенном на рис. *М*, опять $L = 0$ и $T = 0$. Фигуру *Н* можно получить из фигуры *М* точно таким же способом, каким мы получили фигуру *Л* из фигуры *К*. И опять L не изменится, т.е. равен нулю. Кручение участка ленты, проходящего по оси цилиндра, равно -2 , а вклад от наружной спирали составляет $-2 \sin \theta$, так что полное кручение $T = -2(1 + \sin \theta)$. Следовательно, $W = 2(1 + \sin \theta)$.

Фигура рис. *О* похожа на фигуру рис. *Н*; разница только в том, что в последней отсутствует кручение участка ленты, идущего вдоль оси цилиндра. Поэтому $T = -2 \sin \theta$. Однако осевые линии лент у фигур *Н* и *О* расположены в пространстве одинаково, следовательно, W в обоих случаях равен $2(1 + \sin \theta)$. Таким образом, мы можем вычислить порядок зацепления для фигуры *О* по формуле $L = T + W = +2$. Это то же значение L , что у фигуры рис. *И*, т.е. эти две формы можно перевести друг в друга без разрыва цепи. Преимущество подхода с использованием райзинга состоит в том, что он позволяет нам без особого труда рассчитать характеристики структур, подобных той, что изображена на рис. *О*. Он показывает также, что порядок зацепления будет определяться тем, как мы соединим концы клубка, превращая его из открытой структуры в замкнутую.

Для любой замкнутой формы W и T могут изменяться непрерывным образом, в то время как L имеет фиксированное значение. Поэтому экспериментальные измерения, отражающие размер и форму молекул, дадут характеристики, усредненные по разным значениям W и T , но эти средние величины должны различаться для молекул с разными значениями L . Таким образом, мы видим, что в случае сверхспиральной ДНК определяющей характеристикой является вовсе не W , а α ¹⁾.

«бублика» (см. рис.). Левый тороидальный виток получается при закручивании цепей ДНК вокруг этой оси на 360° против часовой стрелки. Необходимо условиться о правилах выбора знака райзинга. Для вторичной структуры ДНК принято считать положительными витки правой спирали. Тогда левому витку, изображенному на рис. 24.4, *А*, должно отвечать условие $-1 < W < 0$, чтобы выполнялось равенство $\alpha = \beta + W$.

Формы с тороидальными витками топологически эквивалентны формам с другим типом витков третичной структуры, называемых взаимно переплетенными (рис. 24.4, *Б*). Проще всего обнаружить эквивалентность в том случае, когда имеется всего один виток. Одна форма переводится в другую простым поворотом этого витка вокруг оси, представ-

¹⁾ Для более детального ознакомления с топологическими свойствами кольцевых ДНК можно рекомендовать обзор: Франк-Каменецкий М. Д., Вологодский А. В. Успехи физических наук, **134**, 641, 1981. — Прим. ред.

ленной на рисунке штриховой линией (или, что то же, путем загибания или отгибания его). Знак спирализации взаимно переплетенных витков определяется направлением закручивания цепей вокруг оси переплетения. В данном случае отрицательная сверхспирализация соответствует обходу вокруг такой оси по часовой стрелке. Следует помнить, что для определения тороидальных и взаимно переплетенных витков используются разные оси. Структура с единственным левым тороидальным витком, изображенная на рис. 24.4, Б, топологически эквивалентна структуре с одним правым витком переплетения. Таким образом, для того чтобы система правил выбора знака была непротиворечивой, мы должны считать W отрицательной величиной в случае правых переплетенных витков третичной структуры, несмотря на то что для правых же тороидальных витков W — как положительная величина.

НАБЛЮДЕНИЕ СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИИ НА ОПЫТЕ

Воспользуемся равенством (24.1) и проанализируем опыт по щелочной денатурации обыкновенной замкнутой двухцепочечной ДНК. Если взаимодействие между парами оснований устранить посредством депротонирования, то между двумя цепями будут действовать силы отталкивания, вызывающие локальное расхождение цепей. Это приведет к некоторому раскручиванию двойной спирали. В результате такого раскручивания β уменьшится, но это означает, что W должно увеличиться, чтобы порядок зацепления α не изменился. Если перед добавлением щелочи W был равен нулю, то увеличение W будет означать, что появились правые тороидальные или левые переплетенные витки третичной структуры. По мере их накопления структура будет все более и более скручиваться (см. рис. 24.4, Б). Образование такой коллапсированной третичной структуры приведет к значительному увеличению коэффициента седиментации.

Равенство (24.1) можно переписать в следующем виде:

$$\alpha = \beta_0 + (\beta - \beta_0) + W = \beta_0 + \tau \quad (24.1a)$$

где β_0 — число витков вторичной структуры, которое имела бы та же ДНК в ненапряженном (релаксированном) состоянии. Уравнение (24.1a) можно рассматривать как определение новой, очень важной величины — так называемого числа титруемых сверхвитков

$$\tau = \alpha - \beta_0 \quad (24.1б)$$

Эта величина, часто называемая просто числом сверхвитков, является в настоящее время единственной характеристикой сверхспирализации, определяемой непосредственно из опыта. Из формулы (24.1a) следует также, что

$$\tau = W + (\beta - \beta_0) \quad (24.1в)$$

т.е. сверхвитки могут реализоваться как в форме витков третичной структуры, или райзинга¹, так и через изменение числа витков вторичной структуры относительно релаксированного состояния, т.е. в форме кручения. В общем случае образование сверхвитков приводит как к изменению кручения ДНК, так и к появлению райзинга. Из формулы (24.1б) видно, что число сверхвитков τ в отличие от порядка зацепления α не является топологическим инвариантом, а зависит от внешних условий, определяющих величину β_0 . Поэтому сверхспирализацию можно создавать искусственно, изменяя условия в опыте так, чтобы это приводило к изменению β_0 .

Однако сверхспирализация существует также в природных ДНК. С открытием этой естественной сверхспирализации впервые обратили внимание на топологические аспекты

¹ Ниже в этом разделе всюду подразумевается эквивалентность понятий райзинга и витков третичной структуры с оговоркой, приведенной в подписи к рис. 24.4. — *Прим. ред.*



РИС. 24.5. Релаксированная и сверхспиральная кольцевая ДНК. На этой фотографии, полученной с помощью электронного микроскопа, показан катенан, образованный двумя кольцевыми молекулами ДНК, одна из которых находится в релаксированной, а другая — в сверхспиральной форме. Препараты были приготовлены по методу Кляйншмидта. (С любезного разрешения М. Shure.)

поведения замкнутых ДНК. Дж. Виноград (J. Vinograd) с сотрудниками изучали ДНК вируса полиомы (рис. 24.2). Они обнаружили, что при нейтральных рН ДНК присутствует в виде двух форм: форма I ДНК имеет коэффициент седиментации 20S, а форма II — 16S. В щелочном растворе они обнаружили три формы ДНК: 16S- и 18S-компоненты (которые было бы логично отождествить с линейными одиночными цепями и одноцепочечными кольцами) и очень быстро седиментирующий 53S-компонент, который соответствовал замкнутой двойной цепи. Рассудив, что различие между двумя нейтральными формами, возможно, сводится всего лишь к одному разрыву в одной из цепей, они обработали их очень малым количеством ДНКазы. В результате такой обработки произошло одновременное уменьшение концентраций нейтральной формы I и щелочного 53S-компонента, которое компенсировалось увеличением содержания нейтральной формы II и щелочных 16S- и 18S-компонентов. Таким образом, форма I действительно не что иное, как замкнутая двойная цепь, а форма II отличается от нее лишь тем, что в ней имеется единственный разрыв в одной из цепей. Почему же тогда скорости седиментации этих двух форм при нейтральных рН настолько различаются? Когда обе формы исследовали под электронным микроскопом, оказалось, что форма I выглядит в гораздо большей степени перекрученной и перепутанной, нежели форма II (рис. 24.5). Это указывало на наличие сверхспирализации. Перед исследователями стояла задача доказать ее существование и определить число и направление закручивания сверхвитков.

В ряде различных способов, которые были придуманы для того, чтобы определить знак и оценить величину τ , был использован один общий подход. В качестве эталона сравнения для замкнутой ДНК, в которой предполагали наличие сверхспирализации, использовали ту же ДНК, но с единственным разрывом в одной из цепей (аналогичную форме II ДНК вируса полиомы). Обычно условия в опыте варьируют таким образом, чтобы это приводило к изменению β_0 у обеих форм, при этом измеряют какой-либо физический параметр, например скорость седиментации, вязкость, количество связанного лиганда или плавучую плотность. Можно ожидать, например, что депротонирование или связывание с этидием приведет к расплетанию двойной спирали, в результате чего β_0 уменьшится. На рис. 24.6 показан типичный результат подобного опыта. С увеличением количества этидия, связанного с ДНК, коэффициенты седиментации открытой и замкнутой форм становятся одинаковыми, а затем снова расходятся. В той точке, где обе формы характеризуются одинаковыми значениями какого-либо из перечисленных выше физических параметров, они должны иметь одинаковую форму и содержать одинаковое количество связанных молекул лиганда. Мы будем называть количество связанного этидия $\bar{\nu}_{кр}$ в этой точке, приходящееся на пару оснований, критической концентрацией данного лиганда на ДНК.



РИС. 24.6. Зависимость коэффициента седиментации ДНК вируса SV40 от концентрации связанного этидия. ДНК в форме I представляет собой кольцевую замкнутую двойную спираль ($\circ$); форма II — это кольцевая двухцепочечная молекула с разрывами в одиночных цепях ($\bullet$). Измерения проводили в 1,0 M NaCl. (Bauer W., Vinograd J., J. Mol. Biol., 33, 141, 1968.)

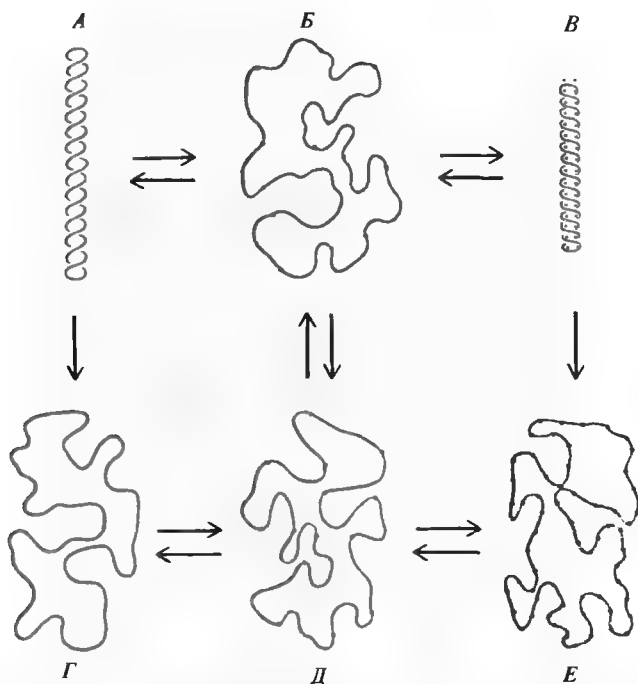


РИС. 24.7. Схематическое объяснение экспериментальных данных, представленных на рис. 24.6. Структуры А—В относятся к форме I ДНК, структуры Г—Е к форме II. В исходной ДНК (структура А) имеется 14 взаимно переплетенных витков третичной структуры, закрученных вправо. Промежуточные формы Б и Д содержат одинаковое количество связанного этидия. Наконец, в насыщенной этидием ДНК в форме I (В) образовалось 14 взаимно переплетенных витков третичной структуры, закрученных влево. (На самом деле неизвестно, к какому типу принадлежат такие витки, т.е. являются ли они тороидальными или взаимно переплетенными.) (Bauer W., Vinograd J., J. Mol. Biol., 33, 141, 1968.)

Райзинг открытой формы II должен оставаться в среднем равным нулю при любой концентрации этидия. Поэтому, связав $\bar{\nu}_{кр}$ молекул этидия на пару оснований, замкнутая форма двойной спирали превратится в структуру, райзинг которой также равен нулю, а $\beta = \beta_0$. Следовательно, в ноль обращается и τ . В результате связывания с этидием β_0 уменьшается. Поэтому, как это следует из формулы (24.16), исходное значение τ у нативной формы I отрицательно, а витки третичной структуры — левые тороидальные либо правые переплетенные. При дальнейшем добавлении этидия концентрация его на ДНК (степень связывания) в конце концов превысит $\bar{\nu}_{кр}$. Это приведет к дальнейшему уменьшению β_0 , и теперь в соответствии с равенством (24.16) τ должно принимать положительные значения (рис. 24.7). Этидий сначала ликвидирует исходную сверхспирализацию, а затем вызывает формирование новых сверхвитков с противоположным направлением закручивания. При достаточно больших концентрациях связанного этидия скорость седиментации комплекса перестает изменяться. Это может быть связано с двумя обстоятельствами. После образования определенного количества сверхвитков дальнейшее связывание ДНК должно быть затруднено. Кроме того, модель с исключением мест связывания подразумевает наличие в ДНК лишь ограниченного числа потенциальных мест связывания с этидием.

Все природные сверхспирализованные ДНК качественно ведут себя точно так же, как и образец, поведение которого иллюстрирует рис. 24.6. У всех этих ДНК в отсутствие этидия знак сверхспирализации один и тот же. Если вместо реакции с этидием использовать щелочное титрование, то наблюдается та же общая картина изменения коэффициента седиментации; это служит еще одним доказательством того, что τ — величина отрицательная.

СВЯЗЫВАНИЕ С КРАСИТЕЛЯМИ КАК СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА СВЕРХВИТКОВ

Чтобы определить величину τ , необходимо знать, как велико изменение β_0 , вызванное связыванием с этидием или любым другим воздействием. Поскольку данные по связыванию обычно представляют в виде отношения числа связанных молекул лиганда к числу пар оснований, которое не зависит от молекулярной массы ДНК, желательно найти аналогичное представление для сверхспирализации. Разделим каждый член равенства (24.16) на β_0 :

$$\sigma = \tau/\beta_0 = (\alpha - \beta_0)/\beta_0 \quad (24.2)$$

где через σ мы обозначили плотность сверхвитков, τ/β_0 . Эта величина показывает, сколько сверхвитков приходится на один виток двойной спирали.

Допустим, что связывание ДНК с одной молекулой этидия или иного лиганда приводит к изменению полного угла закручивания двойной спирали вокруг своей оси на ϕ градусов. Отрицательные значения ϕ будут означать, что ДНК раскручивается. При связывании ДНК с одной молекулой этидия β_0 изменится на $\phi/360$ витков. Имеющийся экспериментальный материал дает основания утверждать, что ϕ не зависит от $\bar{\nu}$ (количества связанного красителя, приходящегося на пару оснований). Поэтому при связывании $\bar{\nu}$ молекул этидия на пару оснований β_0 изменится на $\bar{\nu}\phi/360$ витков в пересчете на пару оснований, или на $10\bar{\nu}\phi/360$ витков на виток двойной спирали. Наличие множителя 10 связано с тем, что $\bar{\nu}$ мы выражаем в числе молекул красителя на пару оснований, а на один виток приходится 10 пар оснований.

Согласно соотношению (24.2), при этом должно происходить соответствующее изменение плотности сверхвитков. Если в исходной невозмущенной ДНК плотность сверхвитков была σ_0 , то при связывании ДНК с этидием или другим лигандом она будет равна

$$\sigma = \sigma_0 - \bar{\nu}\phi/36 \quad (24.3)$$

Эта формула имеет ряд разнообразных и важных применений. Если нам известны ϕ и связь между $\bar{\nu}$ и количеством вводимого в систему лиганда, то в точке, в которой ДНК находится в полностью релаксированном состоянии, $\bar{\nu} = \bar{\nu}_{кр}$, $\sigma = 0$, и мы тут же получаем σ_0 . Если же нам известна σ_0 , можно измерить ϕ при условии, что мы уже определили $\bar{\nu}$, и наоборот.

Более легкой задачей является экспериментальное определение отношения ϕ для двух разных лигандов или отношения σ_0 для двух ДНК. Во всех случаях, когда проводится сопоставление двух образцов с помощью титрования, позволяющего привести число сверхвитков к нулю, мы можем написать

$$\sigma_{01}/\sigma_{02} = (\phi_1/\phi_2)(\bar{\nu}_{кр1}/\bar{\nu}_{кр2}) \quad (24.4)$$

Допустим, что мы имеем одну и ту же ДНК и разные лиганды. Тогда $\sigma_{01} = \sigma_{02}$ и $\phi_1\bar{\nu}_{кр1} = \phi_2\bar{\nu}_{кр2}$. Измерив отношение критических концентраций связанных лигандов, мы можем определить отношение отвечающих им значений угла, на который раскручивается двойная спираль ДНК при связывании с одной молекулой лиганда. Таким способом было

показано, что для целого ряда плоских молекул, которые, как полагают, связываются с ДНК путем интеркаляции, значения угла раскручивания ДНК, приходящегося на одну молекулу лиганда, весьма близки. Другой важный случай применения соотношения (24.4) — сопоставление плотностей сверхвитков различных ДНК. Даже если угол ϕ неизвестен, мы знаем, что он должен быть постоянной величиной, когда используется один и тот же интеркалирующий краситель. Измерив величину $\bar{\nu}_{кр1}/\bar{\nu}_{кр2}$, мы получим отношение значений σ_0 для этих ДНК.

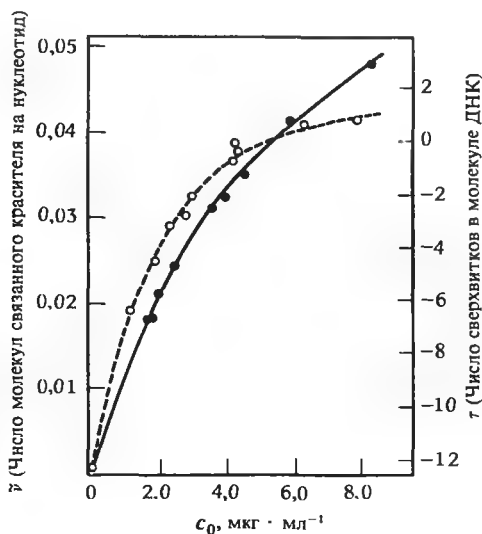
В ранних работах для этидия была получена оценка $\phi = -12^\circ$ при исследовании интеркаляции методом дифракции рентгеновских лучей в пленках и с помощью построения пространственных моделей. В случае щелочного титрования было принято допущение, состоящее в том, что для расплетания одного витка двойной спирали необходимо, чтобы в нем были депротонированы все G и T. Значения τ , полученные в обоих случаях, оказались довольно близкими. В действительности, однако, такое совпадение было, вероятно, в значительной мере случайным, поскольку более поздние оценки ϕ примерно в два раза превышают ранее полученное значение. Помимо неопределенности в значении ϕ , существует еще несколько обстоятельств, затрудняющих практическое использование соотношения (24.3). Согласно данным, представленным на рис. 24.6, скорости седиментации форм I и II ДНК перекрываются в довольно широкой области, из-за этого трудно точно определить $\bar{\nu}_{кр}$. Как мы увидим далее, измерения степени связывания, которые необходимы для того, чтобы определить $\bar{\nu}_{кр}$, представляют более сложную задачу в случае сверхспиральных молекул, чем для незамкнутых кольцевых молекул или линейных двойных спиралей. В конечном счете все, что нам удастся найти из опыта, это то значение $\bar{\nu}$, при котором τ по абсолютной величине минимально. Но мы не знаем, действительно ли τ равно нулю в той точке, которую мы на основании опытных данных называем $\bar{\nu}_{кр}$. Принимая во внимание термодинамику сверхспирализации, следует ожидать, что у релаксированных молекул все еще остается некое распределение по значениям τ , и если это распределение не является симметричным относительно нуля, то среднеседиментационный минимум не обязательно будет соответствовать тому количеству связанного красителя, которое получается из уравнения (24.3).

ЭНЕРГИЯ СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИИ

Рассмотрим термодинамику сверхспирализации и то, как она сказывается на связывании ДНК с лигандами. Прежде всего заметим, что и замкнутой, и открытой *релаксированным* формам должна (по определению) отвечать одна и та же величина свободной энергии и они должны содержать одно и то же количество связанного лиганда. Это означает, что образование разрыва в одной из цепей или, наоборот, сшивание цепи в этом месте (см. рис. 24.7) должны сопровождаться лишь незначительными изменениями $\bar{\nu}$ или конформационной свободной энергии.

В отсутствие лигандов сверхспирализованные молекулы обладают большей свободной энергией, чем открытые формы двойной спирали. Доказательством тому служит тот факт, что при образовании разрыва в одиночной цепи сверхспирализация спонтанно исчезает, при этом молекула переходит в релаксированное состояние. Большая величина свободной энергии в этом случае является результатом уменьшения энтропии при переходе ДНК в более компактную и более упорядоченную сверхспирализованную форму, а также увеличения энтальпии из-за появления напряжений и деформаций в структуре молекулы. Так как при $\bar{\nu} = 0$ нативная сверхспиральная молекула находится на более высоком энергетическом уровне, чем эквивалентная ей во всем остальном открытая форма ДНК, то отсюда с необходимостью следует, что при $\bar{\nu} < \bar{\nu}_{кр}$ свободная энергия связывания всякого лиганда, способного уменьшать число сверхвитков, должна быть меньше для сверхспира-

РИС. 24.8. Степень связывания этидия с ДНК вируса SV40 как функция общего количества этидия, добавленного в растворы ДНК в форме I (пунктир) и в форме II (сплошная линия) при одном и том же содержании ДНК в растворе. В той точке, где изотермы связывания пересекаются, сверхспирализация отсутствует. (Bauer W., Vinograd J., J. Mol. Biol., 33, 141, 1968.)



лизированной формы. Это означает, что при $\bar{\nu} < \bar{\nu}_{кр}$ этидий должен связываться сильнее с нативной ($\tau < 0$) сверхспиральной ДНК, чем с открытыми формами. При $\bar{\nu} > \bar{\nu}_{кр}$ красителю труднее связываться с замкнутой ДНК, чем с открытой, поскольку теперь связывание будет приводить к образованию положительных сверхвитков в замкнутой ДНК, увеличивающих ее свободную энергию. Таким образом, из одних лишь измерений степени связывания этидия можно определить $\bar{\nu}_{кр}$ как ту точку, в которой пересекаются изотермы связывания красителя с формами I и II ДНК. На рис. 24.8 показаны результаты типичного эксперимента такого рода.

Кажущаяся константа связывания для этидия является функцией τ или σ . Различные исследователи нашли, что свободная энергия сверхспирализации, которой определяется вышеупомянутое соотношение, хорошо аппроксимируется соотношением $\Delta G_{\tau} = B\tau^2$, где B — константа. Согласно оценке В. Бауэра и Дж. Винограда (W. Bauer, J. Vinograd), полученной на основе всестороннего анализа кривых связывания, свободная энергия сверхспирализации для нативной ДНК SV40 в форме I (в которой насчитывается 26 сверхвитков) составляет $100 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Позднее была получена несколько меньшая величина (T. Hsieh, J. Wang), но качественно картина остается прежней. Если свободную энергию сверхспирализации распределить равномерно по всей молекуле, то ее количество составит лишь 13 — 25 кал на пару оснований, что недостаточно для того, чтобы вызвать какие-либо локальные структурные изменения, способные существенно изменить химические или физические свойства молекулы. Если бы, однако, какая-то часть энергии сверхспирализации могла сконцентрироваться в одном или нескольких отдельных небольших участках молекулы, то это могло бы привести к структурным изменениям и даже к локальному расплетанию двойной спирали (см. рис. 24.4). И действительно, в некоторых сверхспиральных ДНК обнаружены участки с повышенной реакционной способностью и доступностью оснований для различных агентов. Имеют ли эти участки какое-либо биологическое значение, пока неизвестно¹.

¹ В последнее время было обнаружено, что сверхспирализация может приводить к образованию крестообразных структур в палиндромных участках и к переходу участков с чередующимися пурин-пиримидиновыми последовательностями в левоспиральную z -форму. — Прим. ред.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ СВЯЗЫВАНИЯ КРАСИТЕЛЯ ПО ВЕЛИЧИНЕ СДВИГА ПЛАВУЧЕЙ ПЛОТНОСТИ

Во всех способах определения $\tilde{\nu}_{кр}$, обсуждавшихся выше, основной трудностью остается само измерение числа молекул красителя, связанных со сверхспиральной ДНК. Препараты многих сверхспиральных ДНК довольно трудно получить, а стандартные спектрофотометрические методы определения степени связывания (гл. 23) требуют больших количеств материала. Отличный от этого способ, впервые примененный Дж. Виноградом с сотрудниками, использует изменение (сдвиг) плавучей плотности ДНК при связывании ее с этидием. Плотность этидия меньше плотности нуклеиновых кислот, и к тому же он должен вытеснять протоионы Cs^+ при своем связывании с ДНК. Самый прямой путь — это просто титровать ДНК этидием и определить ту точку, в которой открытая и замкнутая формы одной и той же ДНК имеют одинаковую плавучую плотность. Такой образ действий, однако, потребовал бы много трудоемких экспериментов.

Легкость и точность регистрации обусловленных этидием изменений плавучей плотности позволяет применить другой подход. Допустим, что мы добавили достаточное количество этидия для того, чтобы раскрутились все сверхвитки ДНК в нативном состоянии и,

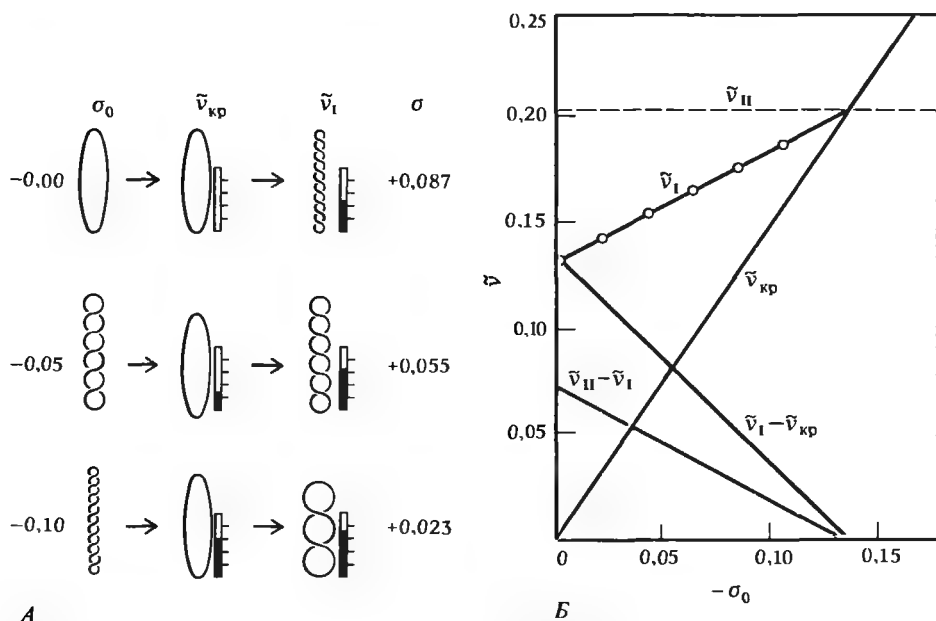


РИС. 24.9. Влияние плотности сверхвитков на связывание с этидием: схема опыта. Одно и то же количество этидия добавляют в каждый из трех растворов ДНК с разной исходной плотностью сверхвитков σ_0 . А. Степень связывания, которая необходима для устранения исходных сверхвитков, равна $\tilde{\nu}_{кр}$. Доля занятых мест связывания показана справа от каждой молекулы на вертикальной шкале. Конечная степень связывания равна $\tilde{\nu}_t$, при этом получается конечная плотность сверхвитков σ . Измерив $\tilde{\nu}_t$, мы можем вычислить σ_0 . Б. Графики зависимости степени связывания от исходной плотности сверхвитков. Горизонтальная прямая $\tilde{\nu}_{II}$ показывает степень связывания этидия с формой II ДНК SV40 при концентрации красителя $330 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Графиком $\tilde{\nu}_{II} - \tilde{\nu}_{кр}$ представлена разность степеней связывания этидия для открытой и замкнутой форм ДНК, определяющая степень разделения последних. (Bauer W., Vinograd J., J. Mol. Biol., 54, 281, 1970.)

кроме того, образовалось некоторое число их, закрученных в противоположном направлении. На рис. 24.9 показан результат такого действия для трех молекул с разным значением исходной плотности сверхвитков (σ_0). Во всех этих случаях мы будем сравнивать конечные уровни степени связывания этидия для открытой и замкнутой форм. Разобьем условно процесс связывания на два этапа. Во-первых, какое-то количество этидия уйдет на то, чтобы превратить каждую замкнутую ДНК в релаксированную кольцевую форму; это количество прямо пропорционально абсолютному значению плотности сверхвитков. Затем будет происходить дальнейшее связывание этидия, которое лимитируется двумя факторами. Для ДНК с высоким значением σ_0 многие из потенциальных мест связывания этидия ушли на то, чтобы свести к нулю исходную сверхспирализацию. Поэтому при $\bar{\nu} > \bar{\nu}_{кр.}$ и открытая, и замкнутая формы связывают более или менее одинаковое количество этидия, поскольку при заполнении немногих оставшихся свободными мест связывания не может образоваться много новых сверхвитков. Напротив, замкнутая ДНК с низким значением σ_0 свяжет в конечном счете гораздо меньше этидия по сравнению со своей открытой формой. Хотя при $\bar{\nu} = \bar{\nu}_{кр.}$ количества связанного красителя равны, при $\bar{\nu} > \bar{\nu}_{кр.}$ связывание с замкнутой формой будет сопровождаться большими затратами свободной энергии из-за возрастания числа сверхвитков, которое сопутствует связыванию. С ростом исходной (в отсутствие красителя) плотности сверхвитков плавучая плотность замкнутых ДНК уменьшается, поскольку связывается больше этидия (при условии, что последний присутствует в избытке). Метод введения красителя в градиент плотности оказывается весьма полезным в качестве препаративного метода для разделения ДНК на основе различий в плотности сверхвитков. Бауэр и Виноград показали, что для двух замкнутых ДНК с разными значениями σ_0 расстояние, на которое они расходятся в градиенте CsCl, пропорционально разности их σ_0^1 . Таким образом, достаточно провести калибровку, и нам потребуется всего один опыт на ультрацентрифуге, чтобы определить σ_0 . Однако сама калибровка все еще требует знания величины угла раскручивания ДНК, приходящегося на одну молекулу связанного лиганда.

Методом, который наиболее способствовал успеху подобных измерений, явился метод конструирования ДНК с заданным значением σ_0 , а не те методы, в которых использовались готовые ДНК, выделенные из природных источников. Ранее мы упоминали, что ДНК-лигаза может сшивать разрывы в открытой кольцевой ДНК, превращая ее в замкнутую форму. Допустим, что еще до обработки лигазой произошло связывание этидия с открытой формой ДНК, при этом связывается $\bar{\nu}$ молей этидия на моль пар оснований. После сшивания разрывов в цепи этидий удалили. Ввиду существования топологических ограничений должны образоваться отрицательные сверхвитки. Из соотношения (24.3) получаем, что после удаления всего этидия плотность сверхвитков будет равна $\bar{\nu}\phi/36$. Таким образом, выбрав величину $\bar{\nu}$ и обработав затем ДНК лигазой, мы можем получать замкнутые молекулы с любым наперед заданным значением отрицательной плотности сверхвитков в отсутствие всякого красителя. Располагая большим количеством исходного материала, мы можем определить количество связанного красителя в ДНК, перед тем как превратить ее в замкнутую форму, путем прямых спектрофотометрических измерений, и, так как ДНК находится при этом в открытой форме, у нас не возникает никаких осложнений из-за влияния сверхспирализации на степень связывания. К сожалению, пока не существует аналогичного способа получения молекул ДНК с положительными значениями плотности сверхвитков при нулевой концентрации связанного красителя.

¹ Такая зависимость согласуется с результатами, которые дает рассмотрение термодинамики четырехкомпонентной (краситель, CsCl, H₂O, ДНК) системы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА СВЕРХВИТКОВ

Все рассмотренные выше способы определения σ_0 предполагают, что нам известен угол, на который раскручивается ДНК при связывании с одной молекулой этидия. Мы уже упоминали, что первоначально полученная величина $\phi \cong -12^\circ$ — это весьма грубая оценка, найденная с помощью построения пространственных моделей, которая согласовалась с результатами измерения угла раскручивания ДНК при щелочном титровании. В этих последних измерениях, однако, имелись некоторые трудности. За происходящими изменениями следили с помощью регистрации коэффициента седиментации или плавучей плотности, но в обоих случаях трудно было определить ту точку на кривой титрования, в которой происходит релаксация сверхвитков. Недавно Уонгу удалось более точно определить положение этой точки: при этом он использовал молекулы с искусственно созданной сверхспирализацией, при титровании которых требовалось порядка 100 или более гидроксильных ионов на молекулу для снятия всех сверхвитков. Из сопоставления результатов измерений в щелочном градиенте плотности с результатами титрования этидием было получено новое значение $\phi = -26^\circ$. При этом все предыдущие оценки числа сверхвитков изменяются приблизительно в два раза.

Имеются другие данные, подтверждающие это новое, большее, значение ϕ . Более точные пространственные модели, опирающиеся на результаты исследования кристаллических структур комплексов красителей с олигонуклеотидами, дают значения от -26 до -28° (гл. 23).

Можно было бы прийти к тому же результату другим путем, отжигая с кольцевой формой ДНК одиночные цепи, комплементарные отдельным участкам ДНК. Природой создана одна такая модельная система в виде D-петли митохондриальной ДНК. Эта промежуточная репликативная форма представляет собой сверхспиральную молекулу, в которой связи между парами оснований разорваны на участке длиной 400 — 500 пар оснований, и на этом участке одна из цепей замещена одноцепочечным фрагментом ДНК (рис. 24.10). Поскольку после удаления этого «лишнего» одноцепочечного фрагмента должно образоваться дополнительное число витков двойной спирали, данный прием можно использовать для определения знака сверхвитков в молекуле.

Конечно, все представленные нами данные о числе сверхвитков не являются прямыми, и скептически настроенный исследователь мог бы все еще сомневаться в справедливости всех допущений, которые лежат в основе определения τ и σ . Для полной уверенности нам нужно было бы как-нибудь суметь сосчитать число сверхвитков. Такой подход был предложен Келлером (W. Keller), который обнаружил, что молекулы ДНК с одинаковой молекулярной массой, но с разными значениями α (т.е. топологические изомеры, или топоизомеры) полностью разделяются при электрофорезе в агарозном геле (рис. 24.11, А, Б). Некоторые образцы он получал, добавляя к нативной сверхспирализованной ДНК SV40

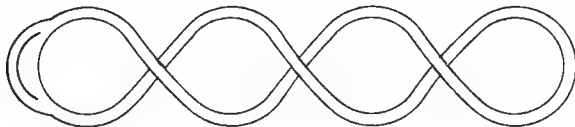


РИС. 24.10. Схематическое изображение D-петли митохондриальной ДНК. Мы видим, что произошла репликация небольшого участка одной цепи и образовавшаяся реплика вытеснила другую цепь родительской молекулы на этом участке. При расплетании двойной спирали, без которого такое вытеснение было бы невозможно, число сверхвитков уменьшается; это служит доказательством того, что первоначальное значение τ было отрицательным. (Bauer W., Vinograd J., 1974.)

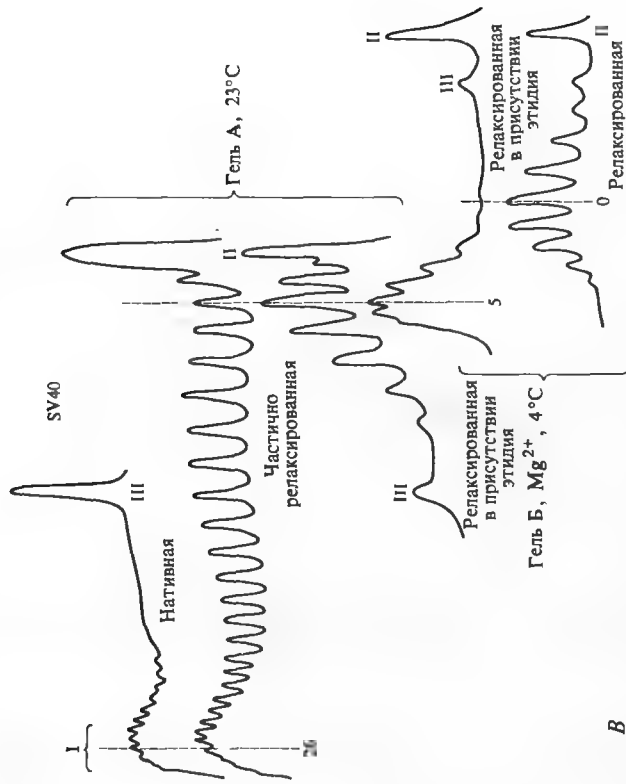
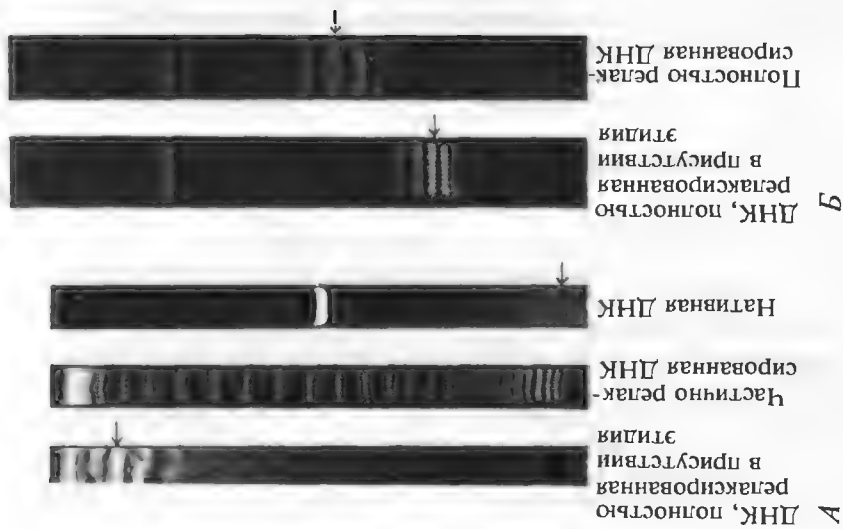


РИС. 24.1.1. Определение числа сверхвитков в ДНК SV40 при помощи электрофореза в агарозном геле и при использовании фермента, размыкающего и замыкающего цепи ДНК. Стрелками отмечены самые интенсивные полосы. *А.* Электрофорез нативной ДНК SV40, частично релаксированной ДНК и ДНК, релаксированной полностью в присутствии этидия. Перед проведением электрофореза этидий был удален. *Б.* Проводимый в других условиях электрофорез полностью релаксированной ДНК SV40 и того же, что и ранее, препарата ДНК, релаксированной в присутствии этидия. *В.* Объединяя результаты, полученные в частях *А* и *Б* рисунка, что становится возможным благодаря использованию одного и того же образца при обоих типах электрофоретических условий, мы можем подсчитать число всех полос. Здесь показан результат денситометрического сканирования гелей. Цифры I, II и III относятся соответственно к нативной сверхспиральной, открытой кольцевой и линейной формам ДНК. (Shure M., Vinograd J., Cell, 8, 215, 1976.)

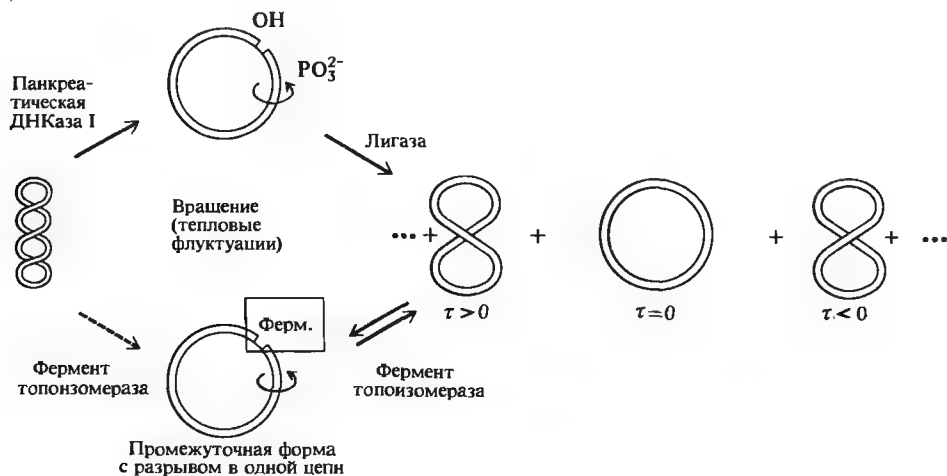


РИС. 24.12. Схема опыта по релаксации сверхспиральной ДНК с помощью ДНКазы или фермента (топоизомеразы), разрывающего и замыкающего цепи ДНК. Конечная равновесная смесь представляет собой некоторое распределение по дискретному набору состояний (по топоизомерам). (Pulleyblank D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4280, 1975.)

фермент, способный уменьшать число сверхвитков (рис. 24.12). Как работает этот фермент — точно не известно, но, очевидно, он должен разрезать одну из цепей или обе, а потом вновь их сшивать. Для того чтобы число сверхвитков могло измениться, фермент должен либо допускать случайную вращательную диффузию в месте разрыва, либо изменять число витков двойной спирали на единицу перед тем, как вновь замкнуть цепи ДНК. Идея о том, что этот фермент работает таким образом, что число витков может изменяться с каждым шагом лишь на одну и ту же величину, большую единицы, кажется наименее приемлемой¹. Так или иначе, должен получиться дискретный набор молекул ДНК с шагом в один сверхвиток. Если бы мы просто сосчитали на рис. 24.11, А полосы, относящиеся к образцу с частично релаксированной ДНК, и предположили, что крайние пики отвечают соответственно нулю и максимальному числу сверхвитков в нативной ДНК, то получили бы $\tau_0 = -26 \pm 1$.

В действительности интерпретация рис. 24.11 несколько сложнее, но результат тот же самый. Нативный образец (рис. 24.11, А) гетерогенен по τ , и наиболее вероятная форма содержит на несколько сверхвитков меньше, чем ее топоизомер с максимальной наблюдаемой сверхспирализацией. Условия в геле в случае, который иллюстрирует рис. 24.11, А, дают высокое разрешение при достаточно высоких значениях плотности сверхвитков. Это позволяет получить хорошее разрешение для распределения (по топоизомерам) сверхспирализованных молекул в нативном образце, но не в релаксированном. При других условиях в геле наблюдается некоторое распределение сверхспирализованных форм и в полностью релаксированном образце (рис. 24.11, Б). Это не артефакт использования фермента, разрывающего и замыкающего цепи ДНК, поскольку при разрезании одиночных цепей ДНКазой и последующем сшивании их лигазой получается тот же результат. Релаксированный образец должен содержать молекулы с $\tau = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ (рис. 24.12). Так как свободная энергия сверхспирализации равна $B\tau^2$, то больцмановское распределе-

¹ См., впрочем, работу Brown O. P., Cozzarelli N. R., Science, 206, 1081, 1979.

ние в равновесной смеси будет иметь вид

$$f_{\tau} = A \exp(-G/RT) = A \exp(-B\tau^2/RT) \quad (24.5)$$

где f_{τ} — относительное содержание изомера с τ сверхвитками, а A — нормировочный множитель. Экспериментальные данные неплохо укладываются в предсказываемую гауссову форму зависимости.

Равенство (24.5) позволяет установить, какая из полос соответствует $\tau = 0$ в релаксационном образце. К сожалению, электрофоретические условия в случае, который иллюстрирует рис. 24.11, *Б*, не дают хорошего разрешения для нативной ДНК SV40. Чтобы объединить результаты, полученные в этих двух гелях, использовали образец, в котором ДНК была полностью релаксирована в присутствии этидия. Затем этидий удалили, получив таким образом некоторое распределение сверхспирализованных молекул по топоизомерам. Этот образец, используемый в обоих гелях, перекрывается с образцами нативной и релаксированной ДНК SV40 в достаточной мере, чтобы мы могли точно определить взаимное расположение всех полос. Подсчитав далее число полос (рис. 24.11, *Б*), нетрудно убедиться, что наиболее вероятное значение числа сверхвитков в нативной ДНК SV40 равно 26. Этот итог в свою очередь мы можем объединить с результатами исследования связывания ДНК с красителем и определить угол, на который раскручивается ДНК при интеркаляции одной молекулы этидия, воспользовавшись соотношением (24.3). В результате имеем $\phi = -23^\circ$, что неплохо согласуется с другими оценками, полученными за последнее время. Равенством (24.5) можно воспользоваться также для определения энергетического параметра B ; найденные отсюда значения довольно хорошо согласуются с теми, что получаются на основе изучения связывания этидия с ДНК в растворе.

Замкнутые двойные спирали представляют собой чрезвычайно чувствительную систему, позволяющую обнаруживать изменения, происходящие в ДНК при связывании с ней лиганда. Это применимо к макромолекулам в той же мере, что и к низкомолекулярным лигандам. Пример такого рода дает изучение связывания РНК-полимеразы с ДНК фага λ . К препаратам ДНК с разным содержанием связанной полимеразы добавляли лиганду, замыкающую цепи ДНК. Затем полимеразу удаляли, измеряли скорость седиментации такой ДНК и сравнивали с препаратом, в котором полимеразы не было вовсе. Разность этих коэффициентов можно было связать с числом образовавшихся благодаря присутствию полимеразы сверхвитков и, таким образом, найти угол раскручивания ДНК в пересчете на одну связанную молекулу, точно так же как в случаях, рассмотренных выше. В результате получили, что угол раскручивания ДНК одной молекулой РНК-полимеразы составляет примерно 260° . Этот результат накладывает очень сильные ограничения на возможную структуру комплекса данного фермента с ДНК.

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ

Является ли сверхспирализация лабораторным курьезом или она необходима для функционирования ДНК *in vivo*? Известно, что число витков релаксированной двойной спирали β_0 довольно сильно зависит от условий опыта. Таким образом, то, что многие кольцевые замкнутые ДНК мы наблюдаем *in vitro* после выделения в сверхспирализованном состоянии, может в принципе просто отражать разницу в значениях β_0 , относящихся к условиям *in vivo* и *in vitro*. Из этой гипотезы следует, что все кольцевые замкнутые ДНК, выделенные из одного и того же организма, должны иметь приблизительно одинаковые плотности сверхвитков, не зависящие от их молекулярной массы. На практике плотность сверхвитков (приведенная к 37°C и $0,2\text{ M NaCl}$) изменяется в широких пределах. Например, для кольцевой замкнутой ДНК бактериофага λ , выделенной из зараженных им клеток *E. coli*, получены значения σ от $-0,032$ до $-0,044$, в то время как для плазмид рSM1 и рSM5 σ равна соответственно $-0,063$ и $-0,092$.

Самый сильный аргумент в пользу того, что сверхспирализация играет биологическую роль, — это существование большого числа ферментов, влияющих на плотность сверхвитков, и тот факт, что после введения антибиотиков, «отравляющих» эти ферменты (или в бактериальных штаммах, в которых этих ферментов нет), нуклеиновые кислоты перестают нормально функционировать. Ферменты, которые изменяют плотность сверхвитков, получили общее название топоизомераз. Можно представить себе четыре типа такой ферментативной активности: уменьшение или увеличение числа положительных или отрицательных сверхвитков. Естественно ожидать, что различные ферменты будут либо обладать одной из них, либо сочетать в себе несколько типов такой активности. Перечислим топоизомеразы, которые были выделены и охарактеризованы к настоящему времени.

1. ω -Белок из *E. coli*: этот фермент катализирует исключительно реакцию уменьшения числа сверхвитков в отрицательно сверхспирализованной ДНК.
2. Продукт гена *NalA* из *E. coli* и топоизомеразы из клеток КВ: эти белки катализируют реакцию уменьшения числа сверхвитков и в положительно, и в отрицательно сверхспирализованной ДНК.
3. Гираза из *E. coli*: этот белок, обнаруженный М. Геллертом (M. Gellert) и др., катализирует реакцию образования отрицательных сверхвитков, используя в качестве источника энергии гидролиз АТР. Гиразы состоят из двух субъединиц: АТРазы, чувствительной к антибиотикам кумермицину и новобиоцину, и продукта гена *NalA*. Изучая влияние различных ингибиторов-антибиотиков, установили, что гиразы участвуют в процессе репликации различных кольцевых и линейных ДНК, а также в транскрипции некоторых оперонов. Полагают, что именно гиразы обеспечивают тот уровень плотности сверхвитков, который мы наблюдаем в нативных ДНК.

Роль сверхспирализации в биологическом функционировании все еще неясна. Известно, однако, что *in vitro* для ряда ферментов субстратом могут служить лишь сверхспирализованные молекулы ДНК.

24.2. Третичная структура РНК

Сверхвитки, которые мы рассматривали выше, относятся скорее к третичной структуре, чем к вторичной, хотя в состоянии конформационного равновесия они представлены на обоих структурных уровнях, между которыми происходит обмен сверхвитками. Имеются также надежные доказательства того, что третичная структура существует и у молекул различных РНК. Здесь мы кратко рассмотрим ряд методов, с помощью которых была получена информация о структуре тРНК в растворе, которая изучена лучше, чем другие РНК. Особый интерес вызывает вопрос о том, как в нуклеиновых кислотах, обладающих третичной структурой, происходят конформационные изменения, такие, например, как развертывание цепи под воздействием тепла.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА СУЩЕСТВОВАНИЯ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ У тРНК В РАСТВОРЕ

Из универсальности общей картины спаривания оснований в тРНК (модель клеверного листа) вытекает, что эта универсальность безусловно должна быть присуща и третичной структуре тРНК. Ряд данных указывает, однако, на то, что модель клеверного листа дает недостаточно полное описание упорядоченной структуры тРНК в водном растворе. Структура, отвечающая модели клеверного листа, типа той, что изображена на рис. 24.13, А (или на рис. 24.17), приводит к ряду следствий, которые оказываются в про-

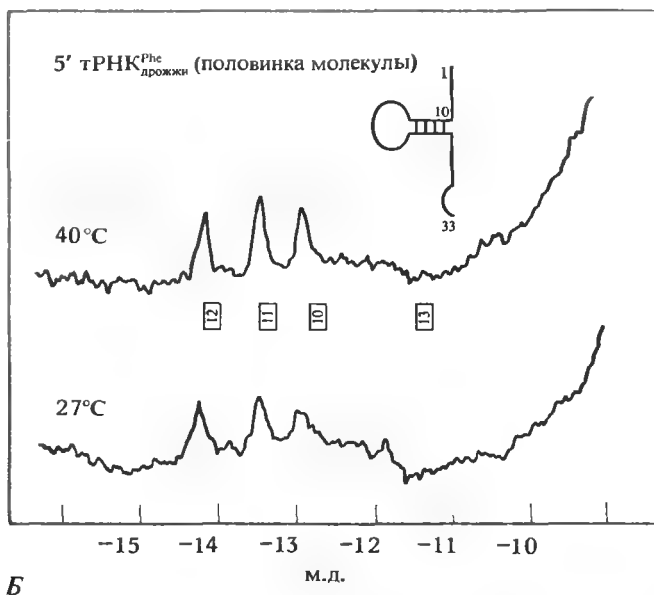
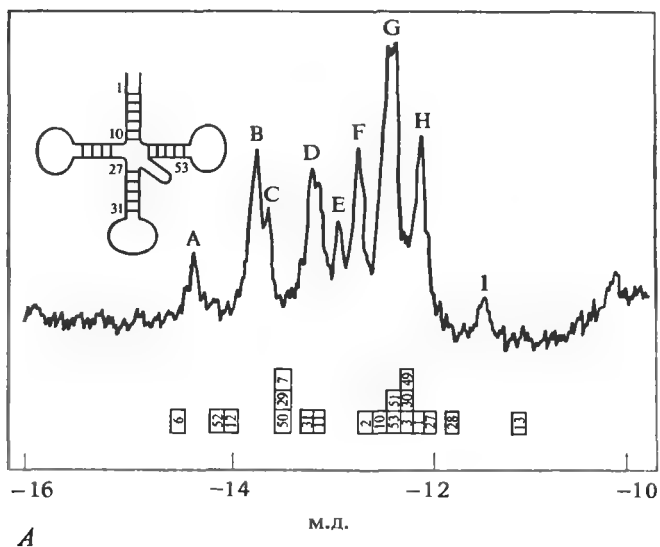


РИС. 24.13. Спектры протонного магнитного резонанса тРНК в H_2O при частоте 300 МГц. А. Спектр целой молекулы дрожжевой тРНК^{Phe}. Квадратики указывают рассчитанные теоретически положения линий ПМР, приписываемых спаренным основаниям, относящимся к вторичной структуре тРНК. Б. Спектр фрагмента дрожжевой тРНК^{Phe} при двух температурах. (Lightfoot D. R. et al., J. Mol. Biol., 78, 71, 1973.)

тиворечии с экспериментальными данными. С точки зрения гидродинамики такая структура в растворе либо должна вести себя как гибкая молекула, либо, если она жесткая, должна быть подобна по своим свойствам сплюсненному эллипсоиду. Однако результаты гидродинамических измерений не согласуются с этими моделями.

Предположение о гибкости тРНК (по крайней мере в наносекундном диапазоне) в основном должно быть отвергнуто, учитывая результаты измерений поляризации флуоресценции, согласно которым время вращательной релаксации τ_D составляет примерно 26 нс. Если допустить, что тРНК представляет собой жесткую сферу, то, согласно расчетам, τ_D должно составлять всего около 12 нс. При наличии гибкости это значение может лишь уменьшиться, а сплюсненные эллипсоиды по своим вращательным свойствам весьма близки к сферам. Таким образом, большие значения τ_D , полученные экспериментально, показывают, что правильнее брать в качестве модели тРНК вытянутую форму и что она должна быть весьма жесткой. Этот вывод подтверждается и рядом других измерений, включая измерения характеристической вязкости ($\sim 6 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$) и коэффициента седиментации ($\sim 4,2S$); обе эти цифры находятся в противоречии с предположением о сферичности тРНК и указывают на наличие вытянутой структуры. Еще одно подтверждение следует из результатов малоуглового рассеяния рентгеновских лучей; полученные данные лучше всего согласуются с тем, что молекула тРНК представляет собой жесткую вытянутую структуру, длина которой заключена в пределах от 85 до 92 Å, а поперечные размеры составляют всего лишь 22 — 35 Å.

На раннем этапе исследований одним из самых сильных аргументов, указывающих на наличие какой-то упорядоченной третичной структуры у тРНК, явилось открытие нативной и денатурированной форм тРНК. Доля спаренных оснований у этих двух форм довольно близка, судя по результатам спектроскопических измерений, поэтому денатурированная форма не может быть статистическим клубком. Однако гидродинамические свойства этих двух форм весьма различны. Денатурированные формы можно получить, удалив из системы ионы Mg^{2+} , и, наоборот, их можно превратить в нативные формы, инкубируя с ионами магния. Эти результаты показывают, что двухвалентные катионы играют важную роль в стабилизации нативной структуры. Из существования денатурированных форм следует, что нативное состояние отвечает некоторой свернутой форме упоминавшейся выше структуры «клеверного листа»; эта форма разрушается после удаления Mg^{2+} . После незначительных изменений во вторичной структуре молекула может изменить свою конформацию, перейдя в денатурированную форму. Эта форма после введения в систему Mg^{2+} метастабильна относительно нативной формы. Однако переход может происходить с весьма малой скоростью.

В другой серии экспериментов, в которых были получены веские доводы в пользу существования третичной структуры, применяли химическую модификацию оснований. Допустим, что структура нативной тРНК полностью соответствует модели клеверного листа. При этом было бы естественно предположить, что существуют два класса оснований, различающиеся по своей способности реагировать с такими агентами, как формальдегид, кетоксаль и перфталевая кислота, которые, как известно, способны модифицировать основания. Какая-то часть молекулы тРНК должна вести себя как одиночная цепь, а другая часть — как настоящая двойная спираль. Однако из опытов следует, что имеются основания, которые, согласно модели клеверного листа, принадлежат к классу раскрытых оснований и в то же время недоступны для агентов, способных реагировать с такими основаниями (см. гл. 3). Эти результаты можно было бы объяснить тем, что в нативной тРНК ветви клеверного листа свернуты так, что образуется упорядоченная третичная структура. Тогда следовало бы так спланировать эксперименты, чтобы они позволили исследовать общую геометрию свернутой формы и выяснить, какие именно взаимодействия ответственны за поддержание третичной структуры.

Из картины химической реакционной способности оснований в нативной тРНК следует, что антикодоновая петля и 3'-конец относительно доступны для химических агентов, тогда как другие потенциальные одноцепочечные участки (например, участок, содержащий триплет ТψС) недоступны. Не зная а priori, какова третичная структура молекулы, очень трудно понять, чем вызвано снижение реакционной способности у тех или иных оснований. Более того, довольно рискованно пытаться вывести заключения о структуре молекулы на основе одних лишь данных по реакционной способности оснований, потому что очень малые структурные изменения могут приводить иногда к большим изменениям в реакционной способности. Однако благодаря тому, что мы располагаем в настоящее время рентгеноструктурными данными по дрожжевой тРНК^{Phe} (гл. 3), мы можем многое понять в картине химической модифицируемости оснований в тРНК.

Главный недостаток опытов по химической модификации оснований заключается в том, что при такой модификации, происходящей с образованием ковалентных связей, могут произойти изменения в структуре тРНК. Даже тогда, когда после модификации сохраняется биологическая активность, мы не можем быть абсолютно уверены в том, что структура не изменилась. Физические методы исследования макромолекул в растворе имеют то преимущество, что применение многих из них никак не связано с риском изменить структуру исследуемых молекул.

ИЗМЕРЕНИЯ ДОЛИ СПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ В тРНК В РАСТВОРЕ

В числе самых первых задач, с которыми столкнулись при изучении структуры тРНК, было определение доли спаренных оснований в молекуле тРНК. Когда к тРНК применили оптические методы исследования, которые были рассмотрены нами в общих чертах в гл. 7 и 8, то обнаружили, что простая модель клеверного листа, представляющая молекулу тРНК в виде набора коротких двойных спиралей и линейных одноцепочечных участков, не в состоянии объяснить наблюдаемые КД или гипохромизм. Отличия таковы, будто в тРНК содержится гораздо больше спаренных оснований, чем этого требует простая модель клеверного листа. Из этого факта немедленно следовало предположение о том, что третичная структура тРНК, возможно, организована с помощью некоторого количества дополнительных пар оснований. Однако оптическими методами нельзя было установить, какие именно пары оснований ответственны за это.

Проанализировав известные последовательности тРНК, обнаружили несколько пар оснований, которые могли в принципе участвовать в стабилизации третичной структуры, но при этом не удалось получить четкой картины, включающей достаточное число пар оснований третичной структуры, которая имела бы столь же универсальный характер применительно ко всем тРНК, как модель клеверного листа. Кроме того, нельзя было полагаться на количественные оценки, полученные с помощью оптических методов, поскольку трудно было учесть дополнительные оптические эффекты, возникающие из-за особой конформации петель, наличия необычных нуклеотидов и возможных различий между структурой двойных спиралей в свернутой тРНК и структурой линейных двойных спиралей. Данные, полученные на основе изучения быстро протекающего водороднотритиевого обмена в тРНК, коррелировали с результатами, полученными оптическими методами, указывая на наличие большего числа взаимодействий между основаниями в нативной структуре, чем это следовало из модели клеверного листа. Однако и в этом случае из-за неопределенностей в интерпретации полученных данных их нельзя было использовать как критерий для строгой проверки различных предлагаемых моделей тРНК.

Основной недостаток оптических методов исследования и быстрого водороднотритиевого обмена заключается в том, что с их помощью мы получаем слишком мало информации об исследуемой системе. Метод ЯМР потенциально гораздо более эффективен,

поскольку можно (в принципе) выделить из наблюдаемого спектра индивидуальные вклады от каждого нуклеотидного остатка. Однако при современных конструкциях приборов большинство полученных спектров ЯМР тРНК нелегко интерпретировать. Спектральные линии от оснований различимы, но все остальное в основном смазано. Исключение из этого правила составляют, однако, протоны NH-групп урацила и гуанина и их минорных аналогов, спаренных с комплементарными основаниями. Как мы видели в предыдущих главах, спаривание оснований приводит к значительным сдвигам соответствующих линий ЯМР в сторону более слабого поля, в результате чего эти линии оказываются в области от -11 до -15 м.д. относительно линии поглощения диметилсиланпентансульфоновой кислоты (ДСС), служащей стандартной точкой отсчета. На этом участке спектра присутствуют только линии NH-групп. Поскольку на каждую пару оснований приходится лишь один протон аминогруппы, следует ожидать, что в случае простого соответствия структуры тРНК модели клеверного листа в этой слабопольной области спектра будет наблюдаться всего 20 пиков резонансного поглощения. Даже допустив существование еще нескольких пар третичной структуры, можно предположить, что полученный в опыте спектр окажется не настолько сложным, чтобы его нельзя было расшифровать.

При изучении этой слабопольной области спектра ЯМР тРНК приходится использовать H_2O в качестве растворителя. Протоны свободных NH-групп обмениваются быстро. В спаренных основаниях обмен этих протонов замедляется (гл. 22). Если скорость обмена мала по сравнению с характеристическими временами ЯМР, то будут наблюдаться линии резонансного поглощения от протонов отдельных NH-групп. На практике, однако, получение спектров ЯМР в случае тРНК может занимать несколько часов из-за необходимости длительного усреднения сигнала. Если в качестве растворителя использовать D_2O , линии ЯМР протонов NH-групп пропадают, как только эти протоны перейдут в раствор. В случае H_2O обмен не влияет на результат, пока он протекает достаточно медленно. На тРНК всегда находится некоторое количество протонов, и (в среднем) каждый протон проводит достаточно много времени в связанном состоянии, что позволяет обнаружить его прежде, чем его место займет другой протон. Трудность при работе с H_2O состоит в наличии большого фонового поглощения растворителя, в котором концентрация протонов в 10^4 — 10^5 раз больше, чем у той или иной NH-группы тРНК, отвечающей данной линии. Этот фоновый спектр и сигналы от других протонов тРНК расположены главным образом в областях спектра, удаленных от участков (-11) — (-15) м.д., но они вносят свой вклад в базовую линию и на этом участке, что сильно затрудняет количественные измерения интенсивностей сигналов от протонов NH-групп.

На рис. 24.13, А показан типичный спектр ЯМР тРНК в слабопольной области. В случае тРНК^{Phe} дрожжей здесь наблюдается 9 четко разрешенных пиков резонансного поглощения от протонов NH-групп. Не все они имеют одинаковую интенсивность, из чего можно заключить, что часть из них представляет собой сумму сигналов от двух протонов или более. Интегрирование спектра (с использованием стандартов сравнения) позволило получить первую оценку числа регистрируемых протонов, что дало цифру 18 ± 1 протонов. Поскольку, согласно модели клеверного листа, в дрожжевой тРНК^{Phe} должно было бы содержаться 20 пар оснований (не считая единичной пары GU), напрашивается самое простое предположение, состоящее в том, что все наблюдаемые линии происходят от тех пар оснований, которые образуют вторичную структуру в модели клеверного листа.

УСТАНОВЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ МЕЖДУ ЛИНИЯМИ В СПЕКТРАХ ЯМР тРНК И КОНКРЕТНЫМИ ПАРАМИ ОСНОВАНИЙ

Чтобы доказать высказанное ранее предположение о том, что спектральные линии на участке от -11 до -15 м.д. отвечают спаренным основаниям, необходимо установить соответствие между наблюдаемыми линиями ЯМР и конкретными основаниями. Самым

общим подходом в этом случае является изучение спектров ЯМР большого числа модельных комплексов из двух олигонуклеотидных цепей. Тогда вклад в спектр ЯМР от пары оснований, принадлежащей данной последовательности (скажем, средней пары AU комплекса $\text{ArUpG} \cdot \text{CrApU}$), можно определить, решая системы из нескольких уравнений, подобно тому как мы поступали при анализе данных, полученных оптическими и термодинамическими методами (гл. 22 и 23). На практике оказывается, однако, что метод ЯМР требует гораздо больших количеств материала, чем оба вышеупомянутых метода, и пока еще не удалось собрать достаточно полную библиотеку экспериментальных спектров сравнения.

Другой способ, с помощью которого можно попытаться привязать линии спектра к конкретным нуклеотидам и которому способствует гораздо большая разрешающая способность метода ЯМР, — это изучение структуры отдельных фрагментов тРНК. Половинки и четвертинки молекулы тРНК должны содержать всего от 4 до 7 пар оснований. Таким образом, достаточно велика вероятность того, что линии ЯМР NH-групп вовсе не будут перекрываться. Это предсказание оправдывается очень хорошо, судя по спектру 5'-половинки дрожжевой тРНК^{Phe}, приведенному на рис. 24.13, Б, который в слабопольной области содержит всего 4 пика. Чтобы привязать каждую из этих линий к соответствующему основанию, прибегают к теоретическим расчетам. Участвующему в образовании водородной связи протону NH-группы изолированной одиночной пары AU или GC должно соответствовать какое-то вполне определенное положение линии резонансного поглощения, сдвинутое в сторону меньших полей относительно соответствующей линии свободного нуклеотида из-за образования водородной связи. Если мы поместим любую пару оснований внутрь двойной спирали, то это приведет к дополнительному сдвигу в сторону больших полей из-за наличия кольцевых токов в основаниях, образующих одно- или двухсторонний стэкинг с основаниями данной пары. Обусловленную кольцевыми токами магнитную анизотропию каждого основания, входящего в состав нуклеиновых кислот, вычисляли квантовомеханическим путем, используя для этой цели наиболее точные из известных приближенных волновых функций.

В гл. 22 мы показали, как эти расчетные значения анизотропии можно использовать для оценки геометрии стэкинга на основе наблюдаемого спектра. При анализе спектра тРНК первоначально было сделано допущение о том, что спирализованные участки представляют собой обычную спираль типа РНК-11. Тогда этими значениями анизотропии можно воспользоваться для того, чтобы предсказать положения пиков резонансного поглощения с учетом взаимного расположения оснований. Так как нам неизвестны характеристические значения напряженности магнитного поля при резонансном поглощении для изолированных пар оснований в H_2O , то эти величины выступают как подгоночные параметры и подбираются по принципу наилучшего соответствия широкому спектру данных, полученных на целых молекулах тРНК, ее фрагментах и модельных олигонуклеотидных комплексах. В результате были получены следующие значения химического сдвига для изолированных пар: $-14,8$ м.д. (AU), $-13,7$ м.д. (GC) и $\sim -13,5$ м.д. (A-ψ). Из-за стэкинг-взаимодействий с соседними парами оснований положения этих пиков могут лишь сместиться в сторону больших полей. Поэтому в ранних работах по тРНК было принято допущение, согласно которому все линии, расположенные в области более слабых полей относительно положения $-13,7$ м.д., принадлежат парам AU¹.

¹ В сравнительно недавно проведенном исследовании рассчитали спектр ЯМР спаренных протонов в дрожжевой тРНК^{Phe}, воспользовавшись значениями координат атомов в молекуле тРНК, определенных посредством рентгеновской кристаллографии. Этот теоретический спектр очень хорошо согласуется с экспериментальным. Однако, согласно этим расчетам, получается, что изолированная пара AU должна иметь химический сдвиг $-14,3$ м.д. и что пики резонансного поглощения, очень сильно смещенные в сторону меньших полей, могут отвечать обратным хугстеновским AU-парам (см. Robillard et al., 1977). В результате некоторые из описанных здесь корреляций между спектральными линиями и парами оснований в тРНК^{Phe}, возможно, придется пересмотреть.

Таблица 24.1

РАСЧЕТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ СДВИГА, ОБУСЛОВЛЕННОГО
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ КОЛЬЦЕВЫХ ТОКОВ
ОСНОВАНИЙ, ОБРАЗУЮЩИХ СТЭКИНГ
ДРУГ С ДРУГОМ^{1), 2)}

5'	3'	5'	3'
U = 0,0	A = 1,3	U = 0,0	A = 1,3
C = 0,0	G = 0,6	C = 0,0	G = 0,7
G = 0,0	C = 0,1	G = 0,0	C = 0,2
A = 0,1	U = 0,0	A = 0,0	U = 0,1
U—A		C—G	
U = 0,1	A = 0,0	U = 0,1	A = 0,0
C = 0,2	G = 0,0	C = 0,25	G = 0,0
G = 0,6	C = 0,0	G = 0,7	C = 0,0
A = 0,7	U = 0,0	A = 1,2	U = 0,0
3'	5'	3'	5'

¹⁾ Shulman R. et al., J. Mol. Biol., 78, 57, 1973.

²⁾ В центре таблицы указана пара оснований, для которой рассчитывается сдвиг. В таблице приведены (в м.д.) расчетные значения сдвига в сторону больших полей, вызванного образованием стэкинга между данной парой и соответствующим основанием, расположенным относительно нее ближе к тому концу цепи, который указан сверху или внизу соответствующего столбца. Рассмотрим, например, комплекс 5'UpC3'·5'GpA3'. Цитозин, образующий стэкинг с парой A-U, расположен ближе к 3'-концу цепи относительно U, поэтому результат их взаимодействия указан в левой нижней четверти таблицы: сдвиг в сторону больших полей, равный 0,2 м.д. Гуанин, образующий стэкинг с той же парой, расположен ближе к 5'-концу цепи относительно аденина, поэтому результат такого взаимодействия указан в той же четверти, т.е. составляет 0,0 м.д. Таким образом, полный результат выражается в сдвиге линии ЯМР протона пары A-U в сторону больших полей на величину 0,2 м.д. Аналогичным образом значения сдвига линии протона GC-пары, обусловленного влиянием оснований U и A, указаны в правой верхней четверти таблицы: U не оказывает никакого влияния на положение линии, а A вызывает сдвиг в сторону больших полей, равный 1,3 м.д.

В табл. 24.1 приведены расчетные значения сдвига в сторону больших полей для различных сочетаний смежных пар оснований. Здесь можно подметить две закономерности. Во-первых, влияние кольцевых токов для пуринов гораздо сильнее, чем для пиримидинов. Во-вторых, сдвиг, вызванный влиянием соседней пары оснований, почти целиком обусловлен основанием 3'-концевого нуклеотида каждого динуклеотида. Эта вторая закономерность легко объяснима. В спирали типа РНК-11 3'-концевое основание любого выбранного динуклеотида частично «накрывает» водородную связь N—H—N соседней пары оснований, в то время как для 5'-концевого основания такое перекрытие незначительно.

Для того чтобы мы могли воспользоваться результатами, приведенными в табл. 24.1, необходимо принять некоторые допущения. Придется предположить, что фактические параметры двойной спирали в спирализованных участках тРНК близки к тем, что наблюдаются в волокнах длинных двухцепочечных РНК. Наибольшее сомнение в этом отношении вызывают те пары оснований, которые расположены на концах двойной спирали, т.е. на стыке двух областей: спирализованного участка и петли. Конечно,

напрашивается предположение о том, что в этих местах происходит некоторая деформация спирали. Еще больше затруднений вызывает вопрос о том, образуют ли основания одноцепочечных участков, смежные с двойной спиралью, стэкинг с этой последней, и если да, то какова геометрия этого стэкинга. При расчетах обыкновенно принимают, что основания одноцепочечных участков, смежные со спиральными, образуют с ними стэкинг и что в случае целой тРНК спирали ССА- и ТψС-ветвей образуют стэкинг друг с другом так, что получается одна непрерывная спираль. Спектры ЯМР чувствительны к подобным структурным особенностям, и поэтому информация о третичной структуре содержится (в принципе) в наблюдаемом спектре. Однако чувствительность эта не всегда достаточно высока, поэтому, прежде чем мы сможем воспользоваться полученными спектрами, их следует тщательнее откалибровать.

На рис. 24.13, Б показаны результаты идентификации линий ЯМР протонов для 5'-половинки молекулы дрожжевой тРНК^{Phe}. Положения трех резких пиков хорошо согласуются с расчетными значениями. Четвертая предсказываемая линия (для пары G²² — C¹³) имеет вид несколько размазанного пика при слегка меньшей, чем предсказывалось, напряженности поля. Это, возможно, указывает на наличие гетерогенности в структуре спирализованного участка 5'-половинки молекулы тРНК; если это так, то сильнее всего она должна проявляться для пары G²² — C¹³, потому что последняя граничит с петлей. Полученные результаты можно объяснить, если допустить, что ориентация основания A¹⁴ в петле может меняться в довольно широких пределах. Аналогичным образом идентифицировали линии в спектрах ЯМР других фрагментов тРНК. Затем, переходя ко всей молекуле, мы предполагаем, что линии ЯМР протонов в спектре целой молекулы сдвинуты не слишком сильно относительно положений соответствующих линий в спектрах ее фрагментов. На самом деле не все из предсказываемых теоретически положений спектральных линий достаточно хорошо коррелируют с положениями наблюдаемых в опыте пиков в спектре целой молекулы или даже в спектрах ее фрагментов (рис. 24.13, Б). Однако полученные корреляции дают довольно хорошее качественное объяснение спектра.

Лучших результатов при анализе спектров ЯМР от спаренных оснований можно добиться, используя более эмпирический подход при идентификации спектральных линий. Как мы увидим ниже, иногда удается наблюдать плавление отдельных спирализованных участков в тРНК. Если такие участки содержат минорные метилированные основания, то в ряде случаев можно однозначно установить, что за участок плавится, наблюдая за линиями ЯМР метильных групп. Установление такой корреляции помогает тогда идентифи-

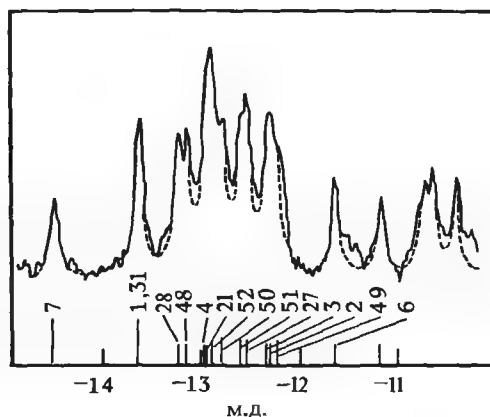


РИС. 24.14. Спектр ЯМР дрожжевой тРНК^{Asp} при 65°C. Показаны спектр, наблюдаемый в опыте (сплошная линия), и спектр, рассчитанный с помощью ЭВМ (штриховая линия). Вертикальными черточками отмечены положения линий ПМР, соответствующих нуклеотидам, номер которых указан рядом с соответствующей чертой. (Robillard G. T. et al., Biochemistry, 15, 1883, 1976.)

цировать пики резонансного поглощения от протонов, участвующих в образовании водородных связей, потому что при таком плавлении все пики, принадлежащие одному и тому же спиральному участку, должны исчезать одновременно. Рис. 24.14 дает пример того, до какой степени можно аппроксимировать спектр ЯМР тРНК, в котором большинство пиков идентифицировано, набором линий, обусловленных вторичной структурой. В рассматриваемом случае изучали образец дрожжевой тРНК^{Asp} при температуре 65°C, когда в тРНК не существует никакой третичной структуры. При этой температуре спиральная часть псевдоуридиловой ветви остается ненарушенной, а спирали антикодоновой и акцепторной ветвей частично расплавлены. Приняв во внимание степень денатурации каждого из этих участков, с помощью ЭВМ рассчитали, какой должен получиться спектр. Налицо прекрасное согласие между результатами вычислений и экспериментом.

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА тРНК И СПЕКТРЫ ЯМР

Успехи, достигнутые в расшифровке спектров ЯМР тРНК, оставляют мало сомнения в том, что вторичная структура тРНК в водном растворе отвечает модели клеверного листа. Однако здесь имеются некоторые «но». В случае тРНК^{Phe} анализ спектра дал первоначально всего лишь 18 ± 1 единичных пиков резонансного поглощения, тогда как «клеверный лист» содержит 20 полноценных пар оснований. Тщательный анализ выявил 19 пиков; оказалось, что не хватает одного пика, отвечающего паре А-У. Ориентировочно этот недостающий пик приписали паре А⁵-U⁶⁸, аргументируя это тем, что разрушение относительно слабой пары А-У могло произойти из-за того, что она соседствует с парой G-U. Однако, как мы знаем теперь на основании рентгеноструктурных данных, в тРНК имеется много пар на уровне третичной структуры, и соответствующие линии NH-групп должны присутствовать в спектре ЯМР. В более поздних работах по расшифровке спектров ЯМР тРНК делались попытки решить эту задачу.

Главный фактор, от которого зависит, сможем мы увидеть спектральную линию или нет, — это скорость обмена соответствующего протона. Когда скорость обмена приближается к значениям, сравнимым с временем жизни протона в одном из двух энергетических состояний в магнитном поле, спектральная линия начинает уширяться, и при некоторой критической скорости обмена ее ширина становится бесконечно большой, т.е. линия перестает быть видимой. При еще больших скоростях обмена протонов тРНК в H₂O линия продолжает отсутствовать, поскольку каждый протон значительную долю времени находится в составе воды, а не в составе данной пары оснований. Поэтому линия исчезает, становясь частью огромного фона поглощения от протонов воды. Пока неясно, выполнение каких условий необходимо для того, чтобы протоны пар оснований вторичной или третичной структуры при какой-либо заранее заданной конформации молекулы обменивались быстро либо, наоборот, медленно. Таким образом, в свете вышеизложенного кажется вполне правдоподобным предположение о том, что некоторые линии ЯМР, первоначально приписываемые парам оснований вторичной структуры, на самом деле принадлежат парам третичной структуры.

Корректировка нормировочных процедур при анализе числа линий в спектрах ЯМР различных тРНК привела в большинстве случаев к увеличению числа протонов, которое должно соответствовать таким спектрам. Для тРНК_f^{Met} и тРНК_f^{Val} из *E. coli* получили соответственно 27 и 26 протонов в слабopольной области спектра, тогда как структура клеверного листа требует лишь 20 протонов. Такие результаты хотя и увеличивают трудности, связанные с расшифровкой спектра, но в то же время и обнадеживают, поскольку, решив задачу идентификации спектральных линий, мы сможем получать информацию о третичной структуре непосредственно из спектров ЯМР. Линии протонов NH-групп, связанные

с третичной структурой тРНК, вряд ли могут быть идентифицированы на основе изучения фрагментов молекулы тРНК или олигонуклеотидных комплексов, поскольку в этих системах отсутствуют взаимодействия, присущие третичной структуре. Вместо этого приходится прибегать к разным способам внесения возмущений в целую молекулу тРНК.

Рис. 24.15 иллюстрирует один весьма перспективный способ идентификации линий в спектре ЯМР тРНК. Свободный нитроксидный радикал присоединили ковалентной связью к 4-тиоуридину, восьмому по счету нуклеотиду в последовательности тРНК_f^{Met} из *E. coli*. Это парамагнитное вещество обладает способностью уширять линии ЯМР протонов NH-групп, расположенных поблизости от него в структуре молекулы. Любые прямые изменения локальных условий, обусловленные введением нитроксида, можно изучать отдельно, восстанавливая последний аскорбиновой кислотой. По сравнению с

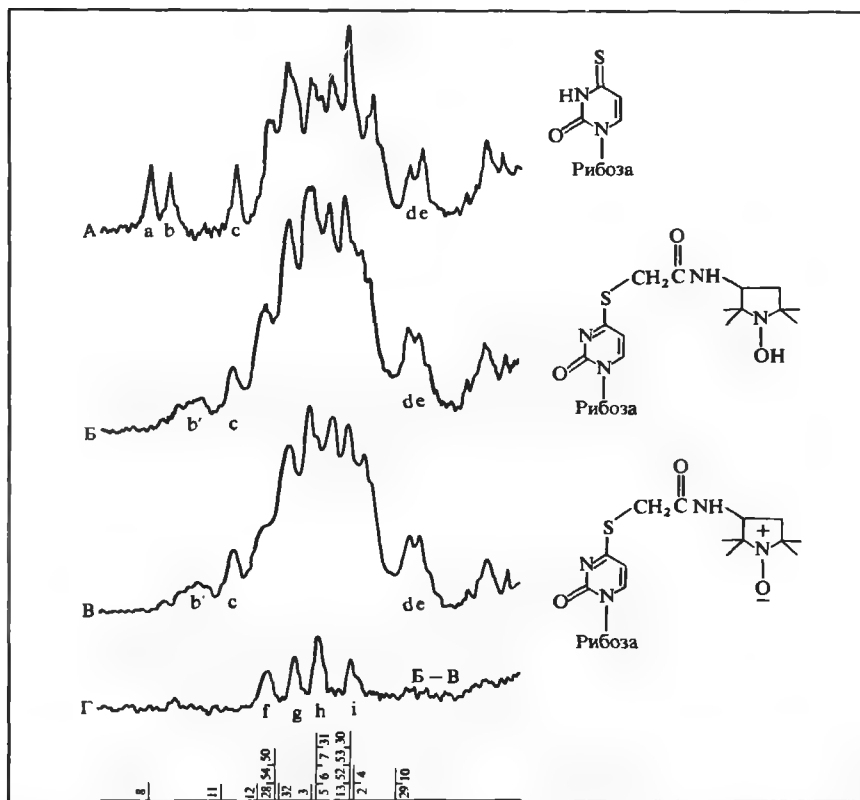


РИС. 24.15. Спектры протонного магнитного резонанса тРНК_f^{Met} из *E. coli* в H₂O при температуре 30°C и частоте 220 МГц. Кривая А представляет собой спектр нативной тРНК. Кривая Б — спектр тРНК, в которой имеется спиновая метка на 4-тиоуридине, восьмом по счету нуклеотиде в последовательности тРНК, после обработки последней аскорбиновой кислотой. Кривая В — спектр тРНК с невосстановленной спиновой меткой на том же 4-тиоуридине. Кривая Г представляет собой кривую Б за вычетом кривой В. Рассчитанные теоретически положения линий, приписываемые протонам вторичной структуры, указаны в нижней части рисунка. (Daniel W. E., Cohn M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2582, 1975.)

тРНК_f^{Met}, не имеющей метки, в спектре ее восстановленной производной со спиновой меткой отсутствует только одна линия (линия «а» рис. 24.15), которую, таким образом, можно приписать протону, в норме участвующему в образовании водородной связи между 4-тиоуридином и А¹⁴. Определив разностный спектр между невосстановленной и восстановленной формами тРНК, получили 4 неперекрывающиеся линии. Пока мы можем лишь ориентировочно идентифицировать эти линии. Сопоставляя расчетные значения химического сдвига с тем, что известно о третичной структуре тРНК, пришли к выводу, что эти четыре пика, по всей видимости, отвечают: GC-паре в спирали акцепторной ветви, GC-паре в спирали дигидроуридиловой ветви и протонам, участвующим в образовании водородных связей двух GC-пар третичной структуры.

Только что описанные нами методики с использованием ЯМР представляют собой в совокупности едва ли не самый эффективный из имеющихся в нашем распоряжении методов изучения структуры нуклеиновых кислот в растворе. Как мы вскоре увидим, они могут также оказаться чрезвычайно полезными в изучении отдельных этапов конформационных переходов нуклеиновых кислот. Методики с использованием ЯМР были применены также к исследованию несколько больших молекул РНК, например 5S-рРНК. Похоже, однако, что применение ЯМР для изучения еще больших молекул РНК будет сопряжено с серьезными трудностями. Число линий от спаренных оснований будет при этом возрастать, к тому же большие значения молекулярных масс почти неизбежно приведут к увеличению времен вращательной корреляции, когда из-за уширения линий, обусловленного дипольными взаимодействиями, значительно ухудшается спектральное разрешение.

МЕДЛЕННО ПРОТЕКАЮЩИЙ ТРИТИЕВО-ВОДОРОДНЫЙ ОБМЕН

Эффективность метода ЯМР заключается в том, что с его помощью можно следить за отдельными нуклеотидами в составе молекулы или по крайней мере не более чем за несколькими нуклеотидами одновременно. Такими же потенциальными возможностями обладает еще один метод, в основе которого лежит медленно протекающий обмен водорода при C⁸ пуринов с тритием (гл. 22). Здесь мы приведем результаты приложения этого метода к тРНК по Гэмблу (R. C. Gamble) и Шиммелу (P. R. Schimmel).

В каждом данном пурине тритиево-водородный обмен должен протекать согласно кинетике первого порядка:

$$\Delta(T)_i = \Delta(T)_{0i} e^{-t/\tau_i} \quad (24.6)$$

где индекс i относится к i -му пурину, $\Delta(T)$ -отклонение в момент времени t от равновесной концентрации трития в составе растворителя, $\Delta(T)_0$ — то же отклонение в момент времени $t = 0$, а τ — характеристическое время затухания процесса. На практике измерения в опытах по водородно-трیتیевому обмену проводят в течение лишь малой доли одного периода затухания. Поэтому равенство (24.6) можно заменить на $\Delta(T)_i = \Delta(T)_{0i}(1 - t/\tau_i)$, что является очень хорошим приближением вышеупомянутого равенства. Для полимера или олигомера, содержащего несколько пуринов, общее количество метки в пуринах составит тогда

$$\Delta(T) = \sum_i \Delta(T)_{0i}(1 - t/\tau_i) \quad (24.7)$$

где суммирование производится по всем пуринам в молекуле.

Уравнение (24.7) можно упростить, учитывая тот факт, что нулевое отклонение $\Delta(T)_0$ должно быть приблизительно одинаковым для всех пуринов. Эта величина, $\Delta(T)_0$, будет зависеть от удельной активности используемой в опыте тритированной воды, от изотопных эффектов, влияющих на конечный равновесный уровень тритиевой метки при обме-

не, и от исходного содержания трития в каждом пурине (которое для типичной постановки опыта равно нулю). Тогда для полимера, содержащего N пуринов, получаем

$$\Delta(T) = N \Delta(T)_0 (1 - t/\bar{\tau}) \quad (24.8)$$

где среднее время обмена $\bar{\tau}$ определяется соотношением

$$1/\bar{\tau} = N^{-1} \sum_i (1/\tau_i) \quad (24.9)$$

τ можно вычислить, измерив полный прирост содержания тритиевой метки в олигомере или полимере в результате обмена.

Для того чтобы выяснить степень влияния вторичной или третичной структуры полимера на скорость обмена, мы должны сопоставить полученный результат либо со скоростями обмена в мономерах (τ_A^0 и τ_G^0), либо со скоростью обмена в чисто одноцепочечном олигомере. Если использовать первый тип сравнения, мы можем вычислить среднее время обмена $\bar{\tau}_0$, ожидаемое в том случае, когда все пурины экспонированы, по формуле (24.9), что дает

$$1/\bar{\tau}_0 = \chi_A/\tau_A^0 + \chi_G/\tau_G^0 \quad (24.10)$$

где χ_A и $\chi_G = 1 - \chi_A$ — доля того и другого пурина в общей сумме пуринов в образце. Результаты обычно выражают через коэффициент замедления тритиево-водородного обмена:

$$R = \bar{\tau}/\bar{\tau}_0 \quad (24.11)$$

Во всех случаях, когда используется формула (24.11), $\bar{\tau}$ — это результат измерений для какой-либо конкретной структуры, а $\bar{\tau}_0$, в зависимости от того, какой способ сравнения принят, либо вычисляют по формуле (24.10), либо определяют опытным путем.

Исследования тРНК методом тритиево-водородного обмена можно проводить при двух уровнях разрешения. Наиболее легкий в экспериментальном отношении путь состоит в том, что после проведения реакции обмена с тритием в нативной молекуле тРНК раствор затем охлаждают и проводят полный ферментативный гидролиз тРНК с помощью эндонуклеазы, например РНКазы T_1 , которая разрезает цепь специфическим образом — после остатков гуанозина. В результате этой процедуры получается набор различных не перекрывающихся между собой фрагментов, которые разделяют, насколько это возможно, при помощи хроматографии или электрофореза. Определив затем уровень радиоактивности в каждом фрагменте, мы можем вычислить его $\bar{\tau}$. Еще больше информации в ряде случаев позволяет получить дальнейший гидролиз каждого отдельного олигонуклеотида из числа фрагментов до мононуклеотидов перед тем, как проводить анализ содержания трития. Таким путем можно определить отдельно прирост содержания тритиевой метки в остатках аденозина и гуанозина в результате обмена и исключить возможные ошибки из-за наличия каких-либо обменных эффектов в пиримидинах. В принципе мы можем пойти еще дальше в развитии этого метода. Применение нескольких сайт-специфичных нуклеаз позволило бы определять скорость тритиево-водородного обмена для каждого из пуринов в отдельности.

На рис. 24.16 приведены некоторые результаты, несущие довольно много информации о структуре тРНК, которые были получены на основе изучения медленно протекающего тритиево-водородного обмена в тРНК^{Phe} дрожжей. Они прекрасно согласуются с известной кристаллической структурой этой тРНК. Участкам, которые заведомо являются одноцепочечными (например, ССА-конец и антикодонная петля), отвечают значения $R < 5$; это говорит о том, что влияние конформации на скорость обмена в данном случае

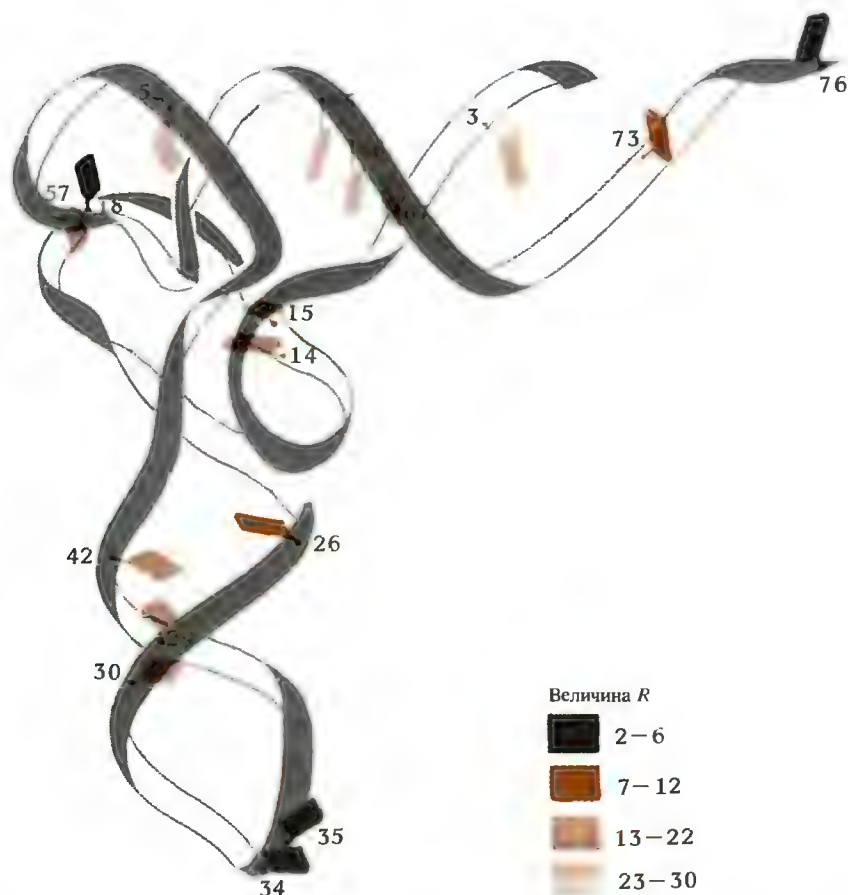


РИС. 24.16. Данные о кинетике обмена трития с водородом при C^8 пуринов в дрожжевой тРНК^{Phe}, представленные совместно со схематическим изображением третичной структуры этой молекулы. Показаны все пурины, для которых в настоящее время имеются данные по водородно-тритиевому обмену при температуре 37°C. Разные цвета, которыми изображены соответствующие основания, показывают относительную скорость обмена. За исключением остатка G^{18} , всем пуринам, участвующим в образовании вторичной или третичной структуры в кристаллической тРНК, отвечает существенно меньшая скорость обмена по сравнению с пуринами неструктурированных участков. (Рисунок Ирвинга Гейса.)

невелико. Пуринам спирализованных участков в тРНК отвечают значения $R > 15$, как и ожидалось, поскольку такие значения характерны для чисто двухцепочечных РНК. В частности, нескольким остаткам, которые принадлежат одноцепочечным участкам в модели клеверного листа, тем не менее отвечают значения R , заключенные в пределах между 15 и 30. В эту группу входят остатки A^{14} , G^{15} и G^{57} . Такой результат можно было ожидать, поскольку эти основания либо вовлечены в образование третичной структуры, т.е. спарены, либо же по крайней мере кажутся плотно упакованными внутри данной структуры (см. рис. 24.16). Единственный результат, никак не согласующийся с кристаллической структурой, — это скорость обмена в G^{18} , для которого получено значение R , равное все-

го лишь 4, из чего можно заключить, что это основание экспонировано и не участвует во взаимодействиях, стабилизирующих третичную структуру. Возможно, при 37°C (температура, при которой обычно проводят измерения скорости тритиево-водородного обмена) происходит тепловое разрушение некоторых элементов третичной структуры, наблюдаемой в кристаллической тРНК при низких температурах, или по крайней мере они ослаблены настолько, что в них наблюдается быстрый тритиево-водородный обмен.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

Третий метод с высокой разрешающей способностью, применяемый для изучения структуры тРНК в растворе, — это получение комплексов тРНК с олигонуклеотидами. Этот метод особенно удобен для идентификации экспонированных оснований, принадлежащих одноцепочечным участкам. Олигонуклеотиды подбирают таким образом, чтобы они были комплементарны коротким отрезкам известной последовательности тРНК. Их способность к связыванию с этой РНК измеряют затем при помощи равновесного диализа. В сосуд, разделенный пополам мембраной, непроницаемой для тРНК, но проницаемой для меньших молекул, помещают по одну сторону мембраны концентрированный раствор тРНК. В другую половину, по другую сторону мембраны, помещают слабый раствор радиоактивного олигонуклеотида. При равновесии концентрация свободного олигонуклеотида должна быть всюду в сосуде одна и та же. Пусть $K_{св}$ — константа связывания для олигонуклеотида, имеющего на данной тРНК единственное место связывания:

$$K_{св} = (\text{Олиго} \cdot \text{тРНК}) / (\text{Олиго})(\text{тРНК}) \quad (24.12)$$

Так как тРНК присутствует в большом избытке по сравнению с олигонуклеотидами, будем считать, что концентрация свободных молекул тРНК равна их концентрации в начале опыта. Далее, записав просто несколько иначе равенство (24.12), получаем отношение полных концентраций олигомера по одну и по другую сторону мембраны при равновесии:

$$r = [(\text{Олиго} \cdot \text{тРНК}) + (\text{Олиго})] / (\text{Олиго}) = 1 + K_{св}(\text{тРНК}) \quad (24.13)$$

Таким образом, измерение $K_{св}$ не вызывает никаких трудностей.

Если на тРНК имеется не одно, а n мест связывания, то в пределе $(\text{тРНК}) \gg (\text{Олиго})$ получаем следующее выражение для r :

$$r = 1 + \sum_{i=1}^n K_{св,i}(\text{тРНК}) \quad (24.14a)$$

Если константы связывания для всех этих n мест связывания более или менее одинаковы, то

$$r \cong 1 + nK_{св}(\text{тРНК}) \quad (24.14b)$$

Результат сводится просто к увеличению кажущейся величины $K_{св}$ в равенстве (24.13); отсюда следует, что в предельном случае большого избытка тРНК по сравнению с олигонуклеотидами нельзя установить, имеется ли на тРНК одно место связывания или несколько. Однако, судя по тРНК с известными нуклеотидными последовательностями, случай, когда в тРНК имеется более двух мест связывания, комплементарных данному тримеру, встречается редко; более того, в ней редко встречаются даже два сайта, комплементарных любому наперед заданному тетрамеру. Таким образом, если ограничиться рассмотрением лишь существенных различий в значениях кажущейся величины $K_{св}$, отвечающих разным олигонуклеотидам, то зависимость от числа мест связывания будет не столь уж существенна при интерпретации данных. Какова должна быть длина олигонуклеотидов, используемых для этой цели? Синтез гетероолигомеров, длина которых больше или рав-

на 4, относительно сложен, а число отличных друг от друга олигонуклеотидов длины n возрастает примерно как 4^n . Однако более длинные олигонуклеотиды обладают большей специфичностью и имеют большую константу связывания. На практике обычно предпочитают компромиссный вариант и работают с олигонуклеотидами, длина которых равна трем или четырем.

Один из эффективных приемов — сопоставление способностей к образованию комплекса у тетрамера и двух входящих в его состав тримеров. Рассмотрим тРНК, содержащую последовательность $3' \dots \text{UpCrGrC} \dots 5'$. Мы будем сравнивать способность к образованию комплекса с данной последовательностью у тетрамера $5' \text{ArGrCrG} 3'$ с аналогичными характеристиками тримеров ArGrC и GrCrG . Если все четыре основания в тРНК принадлежат одноцепочечному участку и могут связываться одновременно с четырьмя комплементарными основаниями тетрамера AGCG , то константа ассоциации последнего должна быть намного больше, чем константы для любого из тримеров. Комплексу с тетрамером будут отвечать при этом три стэкинг-взаимодействия между парами оснований, тогда как комплексу с любым из тримеров — всего лишь два. С помощью табл. 23.4 мы можем оценить средний вклад в величину свободной энергии от этого третьего стэкинг-взаимодействия: это дает примерно $-3 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, что соответствует умножению $K_{\text{св}}$ на коэффициент $\exp(3000/RT)$, или на 148 при температуре 25°C . Если комплементарная последовательность в тРНК расположена не на линейном участке, а в петле, то оценить преимущественное сродство тетрамера по сравнению с тримером несколько труднее, но все же оно должно быть значительным. Если в тРНК доступны только три основания данной последовательности из четырех, то $K_{\text{св}}$ для тетрамера должна быть весьма близка к $K_{\text{св}}$ одного из тримеров. (Можно ожидать, что $K_{\text{св}}$ тетрамера превышает, но не более чем на порядок, $K_{\text{св}}$ тримера, если «лишнее» основание способно образовывать стэкинг на конце двухцепочечного комплекса.) Если соответствующие тримерам последовательности в тРНК не перекрываются и обе доступны, то место связывания тетрамера в тРНК просто соответствует двум независимым «тримерным» местам связывания, а $K_{\text{св}}$ для тетрамера будет в два раза больше $K_{\text{св}}$ каждого из тримеров.

Точно так же для тримеров в качестве эталона сравнения можно использовать связывание тРНК с димерами. Такой подход обычно менее полезен, поскольку многие димеры связываются слишком слабо и не дают полезной информации. Важной контрольной серией во всех экспериментах являются опыты с использованием олигомеров, для которых нигде в данной РНК не существует комплементарной последовательности. Из опытов следует, что такие олигомеры почти всегда связываются с исследуемой РНК гораздо слабее, чем любые полностью комплементарные олигомеры.

РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ СВЯЗЫВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С тРНК

О. Уленбеком (O. Uhlenbeck) были проведены многочисленные опыты по изучению связывания олигонуклеотидов с тРНК^{Tyr} из *E. coli*. Хотя пространственная структура этой тРНК пока еще не известна, мы приведем все же здесь конечные результаты этих исследований, чтобы продемонстрировать возможности этого метода. На рис. 24.17 изображена последовательность данной тРНК, свернутая согласно модели клеверного листа. Уленбеком были получены данные по связыванию 63 из 64 возможных тринуклеотидов с тРНК^{Tyr}, и для 24 из них измеренные константы связывания превышали фоновый уровень, определенный для данной серии опытов. Кроме того, тестированию были подвергнуты 70 выбранных для этой цели тетрамеров из 256 возможных. Лишь для 13 из этих 70 тетрамеров полученные в опыте константы связывания были не меньше удвоенной суммы констант входящих в их состав тримеров (табл. 24.2).

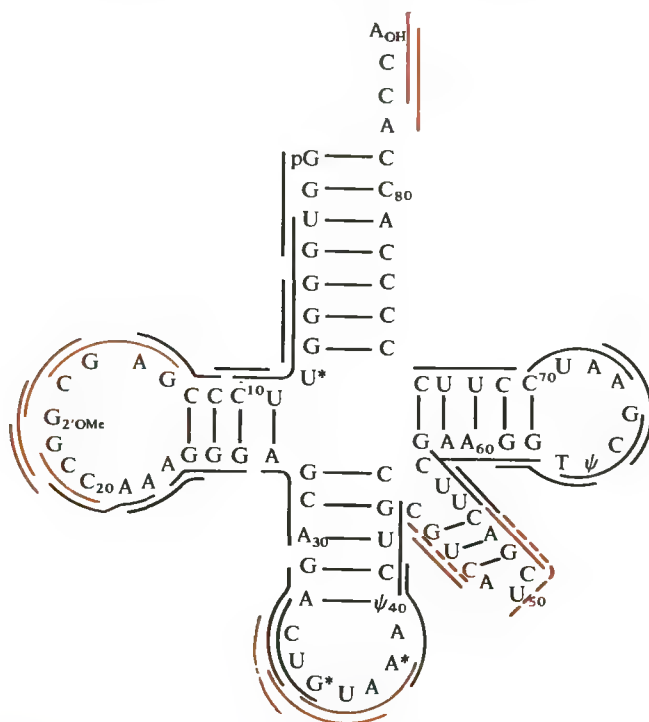


РИС. 24.17. Связывание олигонуклеотидов с тРНК. Здесь схематически показана часть результатов, полученных Уленбеком при исследовании тРНК^{Tyr} из *E. coli*. Сплошными цветными линиями показаны те комплементарные данному участку тРНК олигомеры, которые образуют прочные комплексы с нативной тРНК. Штриховыми коричневыми линиями представлены олигомеры с промежуточными значениями константы связывания. Черными линиями обозначены олигомеры с незначительной способностью к связыванию.

Увеличение константы связывания при переходе к тетрамеру по сравнению с входящими в его состав тримерами варьирует при этом от всего лишь двукратного до 50-кратного; последнее значение было получено для двух тетрамеров: UACA и UAUA, комплементарных антикодону рассматриваемой тРНК. Заметим, что сильное связывание UAUA означает, что пара GU, которая может стоять, согласно гипотезе неточного спаривания (wobble-гипотезе) на месте третьей пары нуклеотидов в комплексе кодон — антикодон, способна и в самом деле увеличивать стабильность двухцепочечного комплекса.

Если сопоставить все полученные результаты по тримерам и тетрамерам, то общий итог сводится к тому, что для связывания с олигомерами доступны всего четыре обособленных друг от друга участка тРНК: концевая последовательность 3'-ACCA, конец добавочной петли и частично антикодонная и диридоуридилловая петли (рис. 24.17). Для многих не укладывающихся в общую картину данных по связыванию олигомеров можно найти разумное объяснение. Оказалось, например, что тримеры, содержащие димер GpG, связываются довольно прочно с последовательностями, содержащими CC, независимо от того, может образоваться третья, соседняя пара оснований или нет. Такой характер связывания вполне объясним, учитывая тот факт, что комплекс GG—CC намного прочнее любых других димерных комплексов (табл. 23.4).

ТЕТРАНУКЛЕОТИДЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ КОМПЛЕКС С $\text{тРНК}^{\text{Тур}}$
С КОНСТАНТОЙ СВЯЗЫВАНИЯ $K_{\text{св}} \geq 2K_{\text{три}}^{1), 2)}$

Тетрануклеотид	$K_{\text{св}}, \text{М}^{-1}$	$K_{\text{три}}, \text{М}^{-1}$	Контрольные тетрамеры	Класси- фикация
UACA	100 000	1800	UACG, UGCA	+
UAUA	37 000	600	UAUG, UGUA	+
UUAC	5 300	900	UUAА, UUAG	+
ACAG	3 800	1900	ACAA, UCAG	±
GCUC	22 000	1800	GCUA, GUCC	+
CCGC	12 500	3900	CUGC	±
GCCG	16 600	4500	—	±
GUCG	8 700	1400	GUCC, UUCG	+
GAUG	4 700	600	UAUG, GAAG	+
GUCU	5 000	900	GUCC	+
GACG	4 700	2000	UACG, GAAG	±
UCGA	3 300	1400	UGCA	±
UGUG	4 200	1500	—	±

¹⁾ Uhlenbeck O., J. Mol. Biol., 65, 25, 1972.

²⁾ $K_{\text{три}}$ представляет собой сумму величин $K_{\text{св}}$ для двух тримеров, входящих в состав данного тетрамера. В таблице приведены значения $K_{\text{св}}$ для тех тетрамеров, все четыре основания которых, как полагают, связываются одновременно с $\text{тРНК}^{\text{Тур}}$ (тетрамеры, для которых $K_{\text{св}} \geq 2K_{\text{три}}$). Контрольные тетрамеры — это тетрамеры, которые по последовательности и нуклеотидному составу близки к рассматриваемым, но не образуют комплексов с $\text{тРНК}^{\text{Тур}}$. В последней колонке дается классификация способных к связыванию с $\text{тРНК}^{\text{Тур}}$ тетрамеров, которые считаются принадлежащими к одному из двух типов: к тетрамерам с сильным (+) или промежуточным (±) родством к тРНК .

Таблица 24.3

КОНКУРЕНЦИЯ МЕЖДУ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ, ОБРАЗУЮЩИМИ
КОМПЛЕКС С $\text{тРНК}^{\text{Тур}}$ ^{1), 2)}

Олигомер	Конкурентный заместитель	$K_{\text{св}}, \text{М}^{-1}$	$K_{\text{набл}}, \text{М}^{-1}$	$K_{\text{к}}, \text{М}^{-1}$
GGC	GGC	102 000	13 000	114 000
GGU	GGC	48 000	46 000	670
UGG	GGC	9 000	9 300	0
UAÇA	GGC	100 000	102 000	0
GUCG	GGC	8 700	8 700	0
GCCG	GGC	16 000	3 000	122 000
GCUC	GGC	22 000	15 000	21 000
GGC	GGU	102 000	97 000	500
GGU	GGU	48 000	11 700	51 800
UGG	GGU	9 000	2 000	58 400
UACA	GGU	100 000	102 000	0
GUCG	GGU	8 700	8 900	0
GCUC	GGU	22 000	22 000	0

¹⁾ Uhlenbeck O., J. Mol. Biol., 65, 25, 1972.

²⁾ $K_{\text{св}}$ — найденная опытным путем константа связывания олигомера с $\text{тРНК}^{\text{Тур}}$. $K_{\text{набл}}$ — константа связывания олигомера, наблюдаемая в присутствии конкурентного заместителя; если при этом получается меньшая по сравнению с $K_{\text{св}}$ константа связывания, то это указывает на наличие конкуренции. $K_{\text{к}}$ — константа связывания конкурентного заместителя, вычисленная при допущении эквимоллярной конкуренции за одно и то же место связывания. Опыты проводили при температуре 0°C.

Мы можем получить дополнительные сведения, изучая конкурентное связывание олигонуклеотидов. Допустим, например, что мы добавили слабо связывающийся и не содержащий радиоактивной метки тример в количестве, значительном по сравнению с присутствующей в растворе тРНК, которая тем не менее имеется в избытке по сравнению с меченым олигонуклеотидом. Тогда присутствие конкурирующих молекул проявится в том, что они образуют комплекс с частью тРНК, величина которой зависит от их константы связывания¹

$$K_k = (\text{Конкурент} \cdot \text{тРНК}) / (\text{Конкурент})(\text{тРНК}) \quad (24.15)$$

Конкурентное связывание приводит к уменьшению концентрации доступной тРНК, с которой может связываться меченый олигонуклеотид; отношение последней к исходной концентрации тРНК равно

$$(\text{тРНК}) / [(\text{тРНК}) + (\text{Конкурент} \cdot \text{тРНК})] = [K_k(\text{Конкурент}) + 1]^{-1} \quad (24.16)$$

Поэтому равенство (24.13) принимает вид

$$r = 1 + K_{\text{св}}(\text{тРНК}) / [K_k(\text{Конкурент}) + 1] \quad (24.17)$$

Константу K_k можно найти, построив зависимость $K_{\text{св}}$ от концентрации конкурирующего олигомера. В табл. 24.3 приведены результаты подобных опытов, проведенных на тРНК^{Tyr}. В простейшем случае конкуренция представляет собой просто прямую ассоциацию с местом связывания соответствующего меченого олигомера. Тогда K_k — то же, что $K_{\text{св}}$, которую можно было бы определить, непосредственно изучая связывание одних немеченых конкурирующих молекул. Этот случай, естественно, мы и имеем, когда используемый в качестве конкурентного заместителя немеченый олигомер идентичен меченому олигомеру.

Заметим, что, согласно результатам, представленным в табл. 24.3, тример GGU, который образует комплекс с A⁸²C⁸³C⁸⁴ на 3'-конце тРНК, конкурирует с UGG, образующим комплекс с последовательностью C⁸³C⁸⁴A⁸⁵, перекрывающейся с первым местом связывания. Точно так же GGC (образующий комплекс с G¹⁸C¹⁹C²⁰ в дигидроуридиловой петле) успешно конкурирует с олигомером GCCG (место связывания которого, C¹⁶G¹⁷G¹⁸C¹⁹, перекрывается с предыдущим). Однако особенно интересно здесь то, что наблюдается также конкуренция GGC с тетрамером GCUC, образующим комплекс с последовательностью G¹³A¹⁴G¹⁵C¹⁶, не перекрывающейся с местом связывания GGC. Из того факта, что полученное при такой конкуренции значение K_k для GGC меньше, чем его же константа связывания $K_{\text{св}}$, измеренная в отсутствие тетрамера, следует, что оба олигомера, GGC и GCUC, могут одновременно образовывать комплексы с дигидроуридиловой петлей, но что после связывания одного из них способность к связыванию второго уменьшается. Ни GGC, ни GGU не влияют на способность к образованию комплексов между РНК и олигомерами, ассоциирующими с участками тРНК, удаленными от мест связывания данных триплетов. Отсюда следует, что при связывании олигомеров не происходит никаких значительных конформационных изменений в тРНК, которые отражались бы на всей структуре молекулы, что лишний раз подтверждает правомерность применения этого метода.

Тестирование структуры молекул с помощью олигонуклеотидов проводили также на других тРНК и на 5S-рРНК. Для тРНК^{Phe} дрожжей были получены не столь подробные данные, как для тРНК^{Tyr} из *E. coli*, но результаты в общем сходны. Из них вытекает, что в молекуле имеются три участка, с которыми могут связываться олигонуклеотиды: ССА-конец, антикодонная петля и часть дигидроуридиловой петли. Существование первых

¹ То досадное на первый взгляд обстоятельство, которое заключается в том, что меченые и немеченые олигонуклеотиды могут реагировать непосредственно друг с другом, образуя комплекс, несущественно, если только этот комплекс проходит сквозь поры диализной мембраны.

двух участков хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа, согласно которым эти участки не имеют вторичной структуры. Существование третьего участка трудно объяснить, исходя из данных рентгеноструктурного анализа, но этот факт неплохо согласуется с результатами исследования медленно протекающего водородно-трифитиевого обмена в тРНК (рассмотренного нами выше), а также с результатами некоторых исследований, использующих химическую модификацию тРНК.

ОБРАЗОВАНИЕ СШИВОК И МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ

Ни один из методов, рассмотренных нами выше, не дает ясного представления о «макроскопической» организации третичной структуры тРНК. Они указывают только, какие основания могут участвовать во взаимодействиях, стабилизирующих третичную структуру, но хотелось бы знать точно, как именно складываются в третичную структуру петли и ветви «клеверного листа» в молекуле тРНК. Существует только один прямой подход, позволяющий ответить на подобный вопрос. Он состоит в том, чтобы как-то оценить расстояние в пространстве между какими-нибудь заранее выбранными точками в молекуле тРНК. Образование внутримолекулярной сшивки между двумя основаниями может служить доказательством того, что эти основания расположены рядом в пространстве, если допустить, что образование данной сшивки не сопровождается деформацией третичной структуры молекулы.

У многих тРНК из *E. coli* восьмым (с 5'-конца) нуклеотидом в ССА-стебле является 4-тиоуридин. Облучение таких тРНК мягким ультрафиолетовым светом приводит к образованию в них фотодимера в результате сшивания этого 4-тиоуридина с цитидином-13, причем квантовый выход этого процесса достаточно высок (рис. 24.18, А). У молекул с

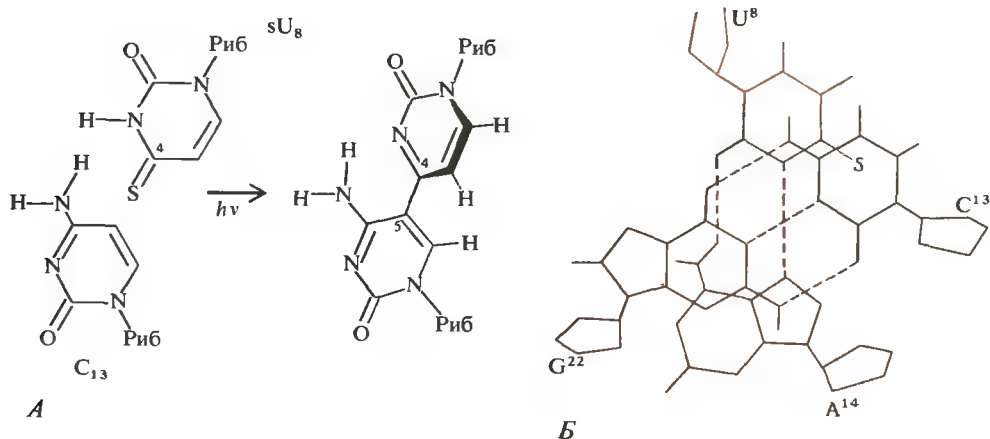


РИС. 24.18. Сшивка, которая образуется во многих тРНК из *E. coli* под действием УФ-облучения. А. Химическая структура фотодимера, который получается в результате образования сшивки между 4-тиоуридином, 8-м по счету нуклеотидом в последовательности тРНК, и цитидином, стоящим на 13-м месте в той же последовательности. (С любезного разрешения N. Leonard.) Б. Взаимное расположение оснований смежных пар $A^{14}-U^8$ и $C^{13}-G^{22}$ в структуре кристаллической тРНК^{Phc} дрожжей. Можно видеть, что основания 8-го и 13-го нуклеотидов находятся в непосредственной близости друг от друга. (Rich A., RajBhandary U.-L., Ann. Rev. Biochem., 5, 205, 1976.)

такими сшивками не обнаружено сколько-нибудь значительных изменений в физических свойствах; большое число разнообразных тестов по проверке функционирования тРНК показало, что молекулы остаются биологически активными. Отсюда мы можем заключить, что в третичной структуре тРНК стебли ССА- и U_{H_2} -ветвей расположены в пространстве таким образом, что 8-й и 13-й нуклеотиды оказываются в непосредственной близости один от другого. Этот вывод отлично согласуется с третичной структурой тРНК^{Phe} дрожжей, полученной по данным рентгеновской кристаллографии (рис. 24.18, Б). Следует, однако, иметь в виду, что в тРНК этого вида нет 4-тиоуридина, так что прямая проверка вышеупомянутой гипотезы оказывается невозможной. Тем не менее имеется много доказательств того, что структуры почти всех тРНК весьма похожи одна на другую.

С помощью метода образования сшивок мы можем получить информацию лишь о таких нуклеотидах, которые расположены близко друг к другу. Если нам не удастся получить сшивку, то мы просто ничего не можем сказать о структуре. Для того чтобы оценить степень близости или удаленности двух точек в молекуле, в нашем распоряжении имеется ряд спектроскопических методов, включая различные приложения магнитного резонанса и миграции энергии электронного возбуждения. Эти методы рассматриваются в других разделах данной книги. Пока что лишь флуоресцентный метод находит широкое применение при исследовании тРНК.

В первых опытах по изучению миграции энергии синглетного возбуждения в тРНК, которые были выполнены Бедсли (К. Beardsley) и Кантором (С. Cantor), было использовано то обстоятельство, что в дрожжевой тРНК^{Phe} имеется естественный люминофор — минорное основание, примыкающее к антикодону. К 3'-концу тРНК ковалентно присоединили различные красители-люминофоры, которые служили акцепторами энергии возбуждения. Эффективность передачи энергии во всех случаях была весьма незначительна; отсюда можно было заключить, что расстояние между 3'-концом и антикодоном превышает 40 Å. Поскольку для нескольких разных красителей был получен один и тот же результат, можно было не опасаться, что интерпретация данных окажется неверной из-за каких-нибудь экстремальных значений κ^2 [член, отражающий геометрию системы, в формуле (8.55)].

Позднее Янг (D. Yang) и Золль (D. Söll) приготовили серию из пяти образцов тРНК с двойной флуоресцентной меткой. Получение таких образцов — задача гораздо более трудная, так как и донор, и акцептор должны быть присоединены к молекуле тРНК посредством ковалентных химических связей. Для получения образцов с различными парами флуоресцентных меток были использованы разные типы тРНК, поскольку многие из этих ковалентно-образованных производных тРНК можно было получить лишь при наличии определенных минорных оснований в нужном участке молекулы тРНК при условии, что их нет в других частях молекулы. На рис. 24.19 представлены результаты, полученные на основе измерений количества энергии, переданной с одного участка молекулы на другой. Если мы будем считать, что третичные структуры всех тРНК идентичны друг другу (игнорируя при этом добавочную петлю), то четыре из пяти полученных таким способом расстояний в молекуле тРНК довольно хорошо согласуются с кристаллической структурой тРНК^{Phe} дрожжей. Это свидетельствует в пользу гипотезы, согласно которой третичная структура тРНК в водном растворе по крайней мере в самых общих чертах совпадает со структурой, наблюдаемой в кристаллической тРНК. В приведенных на рис. 24.19 данных, которые были получены на основе измерений количества энергии, переданной от одного люминофора в молекуле к другому, скрыта некоторая неопределенность, поскольку нам неизвестно точное значение κ^2 (здесь было использовано среднее значение, равное 2/3), но хорошее согласие с другими данными служит косвенным доказательством того, что в этих случаях κ^2 скорее всего не имеет экстремальных значений.

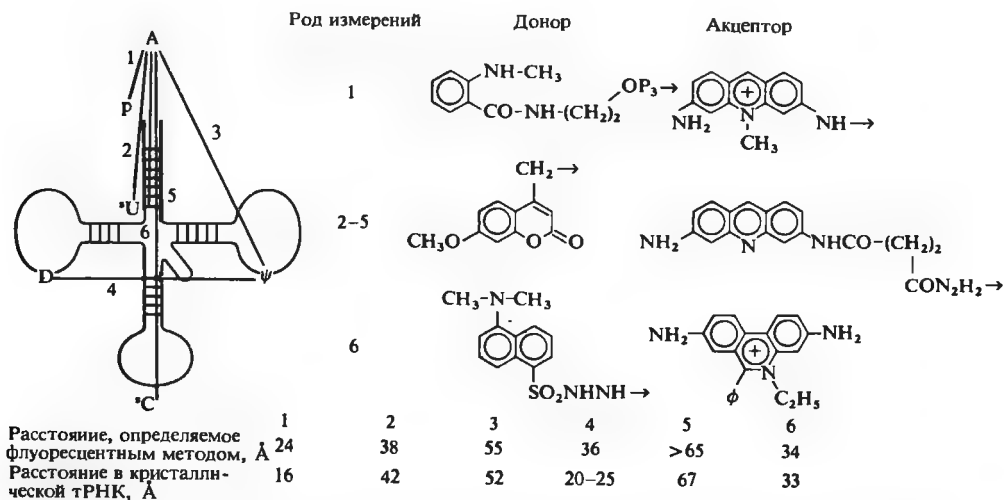


РИС. 24.19. Результаты вычислений внутримолекулярных расстояний, полученные на основе изучения передачи энергии возбуждения с одного синглетного уровня на другой, и сопоставление их с расстояниями, известными из кристаллической структуры тРНК^{Phе} дрожжей. Результаты измерений с номерами 1 — 5 взяты из работы Янга и Золя, с номером 6 — из работы Уэллса и Кантора. Большинство расстояний, определенных на основе изучения миграции энергии возбуждения, хорошо согласуется со значениями, полученными для кристаллической тРНК. Поскольку в этих опытах разные измерения относились к разным тРНК, такое согласие является веским доводом в пользу того, что третичные структуры всех тРНК очень близки друг к другу.

Заметим, что тех данных, которые приведены на рис. 24.19, недостаточно для того, чтобы мы могли однозначно установить геометрию взаимного расположения меченых участков молекулы. Всего в «суммарной» молекуле тРНК получилось, таким образом, шесть точек, к которым были присоединены молекулы красителей: 3'- и 5'-концы, 4-тиоуридин и основания соответственно в антикодоновой петле, петле с последовательностью GTΨC и дигидроуридиловой петле. Измерения количества энергии, переданной от одной точки молекулы к другой, могут дать лишь расстояния, которые являются скалярной величиной, а не вектором. Для того чтобы определить взаимное расположение N точек в пространстве, в общем случае требуется определить $4N - 10$ расстояний между этими точками (для $N \geq 4$). При наличии шести точек в тРНК с люминесцентными метками, ковалентно присоединенными к молекуле, это означает, что необходимо измерить 14 из 15 возможных расстояний между этими точками, чтобы определить их расположение в пространстве. Пять расстояний — это слишком мало. Даже если мы измерим все 14 расстояний, фигура все равно будет не определена относительно преобразования зеркального отражения. Расстояния, поскольку они являются скалярами, инвариантны по отношению к этому преобразованию, чего нельзя сказать о геометрической фигуре, которая, вообще говоря, асимметрична. Однако в совокупности с другой имеющейся в нашем распоряжении информацией о структуре молекул тРНК даже несколько цифр, полученных для внутримолекулярных расстояний описанным выше способом, оказываются весьма полезны и существенно уменьшают число возможных третичных структур, заслуживающих того, чтобы ими занимались в дальнейшем.

Явлением миграции энергии от одной точки молекулы к другой можно также воспользоваться для локализации в тРНК мест связывания с другими молекулами. Например, в

присутствии достаточного количества Mg^{2+} , гарантирующего наличие нативной третичной структуры у тРНК, в последней имеется единственное место прочного связывания с этидием. Этот связанный этидий был использован Уэллсом (B. Wells) и Кантором в качестве акцептора энергии, поступающей от молекулы красителя, которая присоединена к 3'-концу; в результате для расстояния между этими двумя красителями в молекуле тРНК была получена величина 34 Å. Анализ третичной структуры тРНК^{Phe} показывает, что единственно возможное место связывания, расположенное на указанном расстоянии от 3'-конца, на участке, обладающем вторичной структурой, помещается между шестым и седьмым основаниями (рис. 24.19). Данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР согласуются с такой локализацией, однако из рентгеноструктурных данных следует неожиданный вывод, который заключается в том, что при связывании этидия интеркаляции не происходит.

ДИАГРАММА СОСТОЯНИЙ ДЛЯ КОНФОРМАЦИЙ тРНК

По мере изменения окружающих условий в молекуле тРНК могут происходить различные структурные изменения. К параметрам, характеризующим окружение, влияние которых к настоящему времени изучено достаточно подробно, относятся концентрация одновалентных ионов, температура, концентрация двухвалентных ионов и pH. Изучение структурных изменений в тРНК, вызванных изменением окружающих условий, представляет интерес в том отношении, что эти изменения могут быть подобны возможным конформационным изменениям, связанным с функционированием тРНК, когда последняя образует комплексы с аминоксилсинтетазами, с факторами, участвующими в синтезе белка, или с рибосомой. Значительно легче изучать конформации отдельно взятой тРНК, чем исследовать гораздо более крупные нуклеопротеидные комплексы. Исследование конформационных изменений в тРНК может также увеличить сумму наших знаний о силах, стабилизирующих нативную структуру тРНК. Кроме того, такие исследования могут помочь при планировании структурных исследований на более сложных РНК, для которых пока не удалось добиться высокого разрешения при попытках применения рентгеновской кристаллографии или ЯМР.

Мы ограничимся здесь рассмотрением влияния одновалентных ионов и температуры, поскольку зависимость конформации тРНК от этих двух параметров изучена довольно подробно. На примере одной из тРНК, тРНК^{Met} из *E. coli*, мы покажем, каким образом удается проследить за каждым из конформационных изменений в отдельности и проанализировать их. Для других тРНК, по которым имеются подобные данные, результаты качественно похожи на те, которые получаются в рассматриваемом случае, хотя и отличаются от них в ряде существенных деталей. Понятно, что эти отличия как-то связаны с особенностями функционирования тРНК, поскольку тРНК^{Met} ответственна за инициацию белкового синтеза, но в отличие от всех других тРНК не участвует в процессе удлинения белковой цепи. Однако единственное явное различие во вторичной структуре между тРНК^{Met} и другими тРНК состоит в том, что в первой недостает одной пары оснований, которая должна была бы находиться на конце ССА-стебля (рис. 3.7). Судя по известной третичной структуре тРНК^{Phe} дрожжей, мы не можем утверждать наверняка, что разрыв пары оснований в этом месте должен вызывать какие-либо структурные изменения в других частях молекулы. Шульман (L. Schulman) показал, что после химических модификаций, приводящих к образованию «недостающей» пары на конце ССА-стебля тРНК^{Met} из *E. coli*, эта тРНК приобретает многие функции, свойственные «нормальным» тРНК. Таким образом, есть некоторые основания утверждать, что приводимые ниже результаты не слишком тесно связаны с особой функциональной ролью тРНК^{Met}.

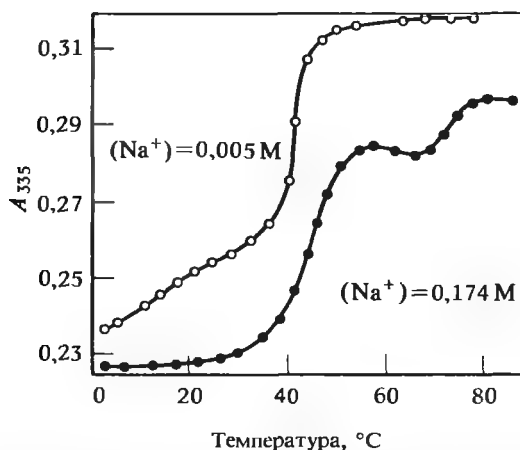


РИС. 24.20. Плавление $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ из *E. coli*, регистрируемое с помощью измерения поглощения света при 335 нм, для двух различных концентраций соли. При этой длине волны в основном регистрируется поглощение только 4-тиоуридина; такой способ регистрации, как оказалось, обладает большей чувствительностью к изменениям третичной структуры молекулы, чем поглощение при 260 нм. (Cole P. E. et al., *Biochemistry*, **11**, 4358, 1972.)

Прежде всего необходимо определить те критические значения температуры и концентрации Na^+ , при которых происходят значительные конформационные изменения. Обычно за конформационными превращениями в тРНК следят по изменению поглощения при длине волны 260 нм. В случае $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ из *E. coli* оказалось очень полезно дополнить эти данные измерениями поглощения при 335 нм. Последние почти исключительно отражают окружение 4-тиоуридина, восьмого по счету нуклеотида в последовательности данной тРНК. При этой длине волны оказалось легче отделить одно от другого различные накладываются друг на друга конформационные изменения, примером чему может служить плавление рассматриваемой тРНК под действием тепла, которое при этой длине волны имеет отчетливо выраженный двухфазный характер (рис. 24.20). Данные, полученные при 260 нм, также свидетельствуют о двухфазном характере плавления, но эти фазы гораздо труднее отделить одну от другой, поскольку переход, происходящий при более низкой T_m , сопровождается весьма малым изменением поглощения света. 4-тиоU не входит ни в один из участков вторичной структуры, следующих из модели клеверного листа, но, очевидно, участвует в стабилизации третичной структуры. Таким образом, поскольку этот переход происходит в низкотемпературной области и сопровождается очень большим изменением поглощения при 335 нм, отсюда немедленно следует предположение о том, что он связан с изменениями в третичной структуре.

На основании результатов исследований плавления $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ под действием тепла при разных ионных силах оказалось возможным построить для нее диаграмму состояний способом, описанным в гл. 22 для $\text{poly}(\text{A} \cdot \text{U})$ (рис. 24.21). Имеющиеся данные указывают на существование четырех «фазовых состояний» этой тРНК в отсутствие Mg^{2+} . Форма, устойчиво существующая при низких температурах и высокой ионной силе (форма I), почти наверняка представляет собой тРНК, имеющую нативную третичную структуру. Добавление Mg^{2+} , который, как известно, стабилизирует нативную структуру тРНК, очень мало влияет на ее поглощение в этой области. У формы, стабильной при высоких температурах и низкой ионной силе (форма IV), гипохромный эффект очень близок к нулю. Таким образом, эта форма в основном представляет собой лишенный вторичной структуры

статистический клубок. Точное положение точек «фазового равновесия» между двумя другими формами (II и III) не удалось определить достоверно на основе имеющихся экспериментальных данных. И нетрудно видеть почему: прямое взаимное превращение II $\leftrightarrow$ III не удается отделить от других типов превращений, наблюдая плавление под действием тепла при постоянной концентрации соли. В принципе можно было бы изучать переход типа II $\leftrightarrow$ III, варьируя концентрацию ионов натрия. Однако изменение оптической плотности, сопровождающее данный переход, слишком мало (как можно заключить на основе данных, представленных на рис. 24.21), поэтому полученные результаты вряд ли будут надежными.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В тРНК

Ряд данных указывает на то, что области II и III на рис. 24.21 соответствуют разным конформациям тРНК. Наклоны, $dT_m/d[\lg(\text{Na}^+)]$, кривых равновесия фаз II — IV и III — IV отличаются друг от друга почти в два раза. Меньший наклон кривой, разделяющей на рисунке фазы III и IV, указывает на то, что связывание Na^+ играет менее важную роль в стабилизации формы III по сравнению с формой II. Такой вывод согласуется с тем фактом, что при постоянной температуре образование формы III тем выгоднее по сравнению с формой II, чем меньше концентрация соли. Еще более убедительные результаты, свидетельствующие о возможности существования тРНК в нескольких различных конформациях, были получены с помощью кинетических исследований. В последних переход III $\rightarrow$ I вызывали путем быстрого увеличения концентрации ионов Na^+ и следили далее за изменениями оптической плотности. При этом наблюдается очень медленная кинетика первого порядка, которой отвечает время релаксации, равное 1200 с при температуре

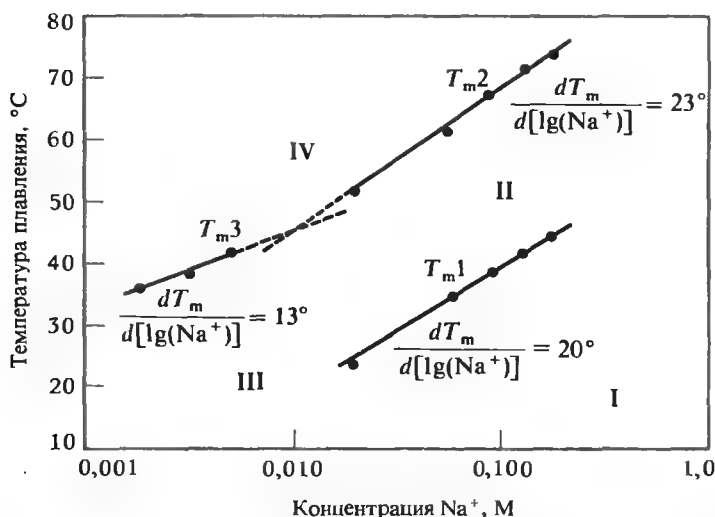


РИС. 24.21. Диаграмма состояний тРНК_{Met} из *E. coli* при нейтральных pH. Эта диаграмма была построена по данным, полученным при анализе кривых плавления, аналогичных тем, что показаны на рис. 24.20, и подтверждается результатами кинетических исследований. См. рис. 24.22, который дает наглядное представление о структурах тРНК в каждом из этих четырех фазовых состояний. (Cole P. E. et al., Biochemistry, 11, 4358, 1972.)

13,3°C. Энергия активации данного процесса составляет $61 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ — это очень большая величина. Столь большая продолжительность релаксационного процесса позволяет определить положение средней точки перехода I $\rightarrow$ III при таких малых концентрациях соли, при которых регистрация перехода I $\rightarrow$ III во всем интервале плавления оказывается невозможной.

Для измерения скорости перехода I $\rightarrow$ II приходится проследживать во времени релаксационные процессы, индуцированные скачком температуры, поскольку этот переход происходит слишком быстро, что не позволяет использовать резкое изменение концентрации соли в качестве методического приема. В области самых низких температур, при которых еще можно наблюдать указанный переходный процесс, время релаксации τ для этого перехода составляет около 7 мс и не зависит от температуры, из чего следует, что переходу отвечает нулевая энергия активации. В области более высоких температур уже наблюдается заметная зависимость τ от температуры, что позволяет оценить кажущуюся энергию активации, которая оказывается равной $50 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Большая разница в скоростях переходов I $\rightarrow$ III и I $\rightarrow$ II означает, что состояния II и III отличаются друг от друга коренным образом. Коул (Р. Е. Cole) и Крозерс (D. Crothers) показали, что наблюдаемые различия в энергиях активации на разных стадиях конформационных изменений позволяют сделать ряд особенно интересных выводов. Для релаксационных процессов, характеризующих переход I $\rightarrow$ II, единственное определяемое из опытов τ должно удовлетворять соотношению $\tau^{-1} = k_{I \rightarrow II} + k_{II \rightarrow I}$. При температурах, существенно более низких, чем T_m перехода, $k_{II \rightarrow I} \gg k_{I \rightarrow II}$, поэтому наблюдаемая в опыте нулевая энергия активации должна соответствовать переходу II $\rightarrow$ I. И наоборот, выше T_m полностью преобладает $k_{I \rightarrow II}$, так что этому переходу должна соответствовать энергия активации порядка $50 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Так как переходу II $\rightarrow$ I отвечает нулевая энергия активации, то это означает, что внутри формы II не нарушаются никакие существенные взаимодействия перед превращением ее в форму I. Поэтому похоже, что форма II потеряла часть присущих нативной форме I тРНК взаимодействий в третичной или вторичной структуре, но не приобрела новых.

Скорость взаимных превращений I $\rightarrow$ II на несколько порядков меньше скорости плавления простой шпилькообразной структуры, которое, как было показано нами ранее, происходит в течение микросекунд. Поэтому этот переход должен сопровождаться какими-то изменениями в третичной структуре. Трудно, однако, объяснить столь большую энергию активации для перехода I $\rightarrow$ II одними изменениями в третичной структуре, поэтому вполне логично было бы предположить, что отвечающее переходу конформационное изменение включает в себя еще и утрату некоторой части вторичной структуры, чем и объясняются большие изменения в энтальпии. Переход I $\rightarrow$ II предположительно связан с утратой всей третичной структуры и плавлением спирального участка дигидроуридиловой ветви (рис. 24.22). Последний, согласно приводимым выше результатам термодинамического анализа конформаций РНК, является наименее стабильным из всех участков вторичной структуры в тРНК.

Значительная энергия активации, отвечающая переходу III $\rightarrow$ I, указывает на то, что это должен быть совершенно иной процесс по сравнению с переходом II $\rightarrow$ I. В частности, в структуре III должно иметься достаточно много взаимодействий между основаниями, отсутствующих в структуре I, и все они должны быть разрушены, прежде чем произойдет рассматриваемое конформационное изменение. Логично предположить, что форма III представляет собой шпилькообразную структуру (см. рис. 24.22). Такая вытянутая структура должна обладать меньшей свободной электростатической энергией по сравнению со структурой клеверного листа или третичной структурой нативной тРНК, поэтому она должна быть более стабильной при низких ионных силах. Представление о вытянутой конформации тРНК при очень низких концентрациях соли подтверждается результатами гидродинамических исследований.

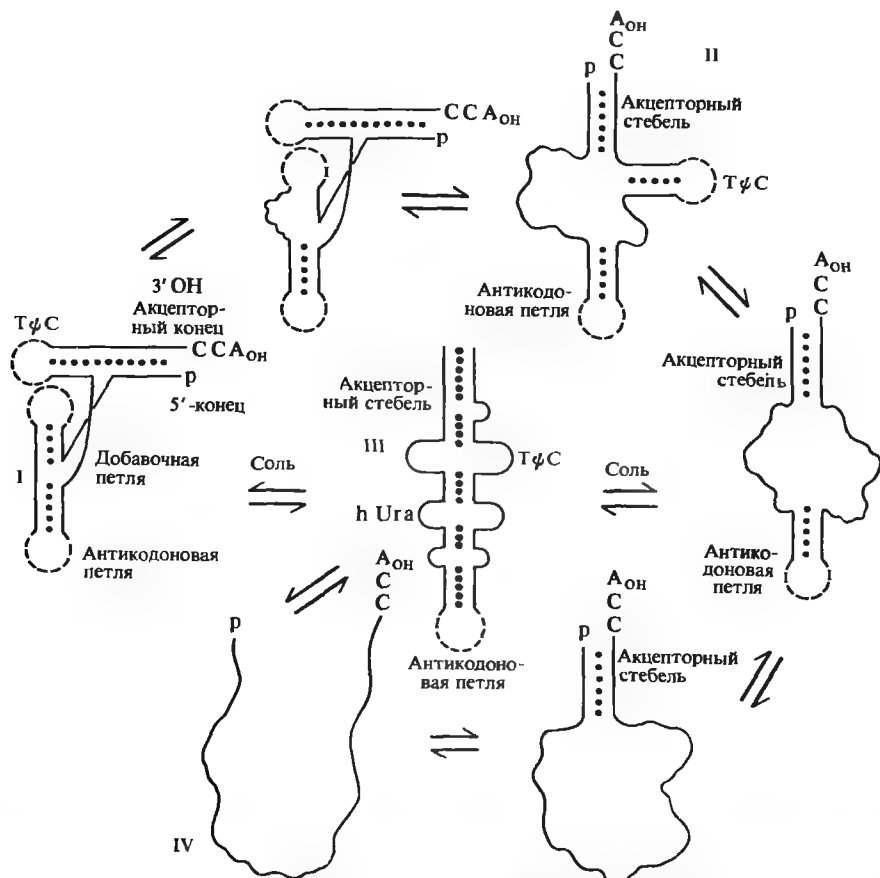
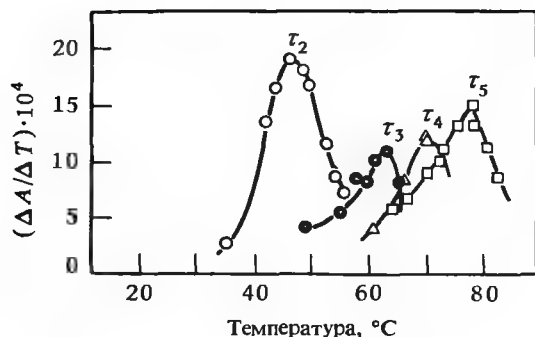
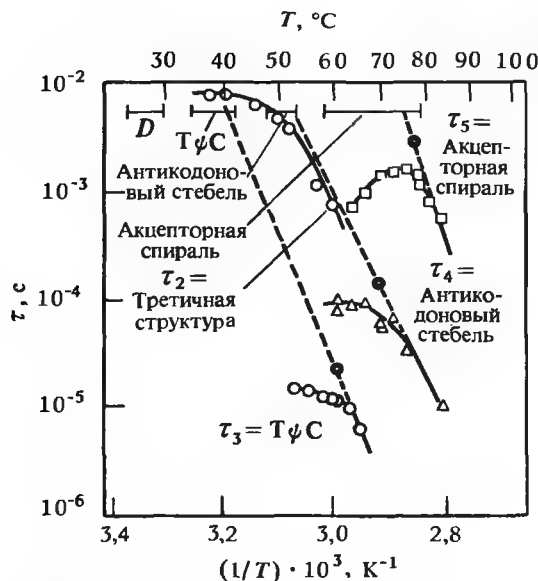


РИС. 24.22. Схематическое изображение различных стадий плавления тРНК^{Met} из *E. coli* под действием тепла. Порядок, в котором разрушаются различные участки структуры, был установлен с помощью ЯМР и кинетических исследований, которые иллюстрирует рис. 24.23. Указаны также те четыре состояния структуры (I — IV), которые, как полагают, отвечают соответствующим областям диаграммы состояний этой тРНК, изображенной на рис. 24.21. Другим цветом выделена та форма тРНК, которая оказывается стабильной лишь при низкой концентрации соли и низких температурах (форма III). (Crothers et al., 1974.)

Конформационное изменение II → IV кажется лишенным каких-либо особенностей при регистрации равновесного плавления под действием тепла, но кинетические исследования индуцированных в тРНК релаксационных процессов показывают, что это не так. В интервале температур, в котором происходит данный переход, было зарегистрировано три различных релаксационных процесса. Их можно отделить друг от друга, несмотря на то что соответствующие им интервалы температур перекрываются, так как они протекают с совершенно различными скоростями. Результаты, представленные на рис. 24.23, показывают, что кинетические исследования достаточно эффективны при анализе конформационных изменений. Однако при этом очевиден также и главный недостаток таких исследо-



A



B

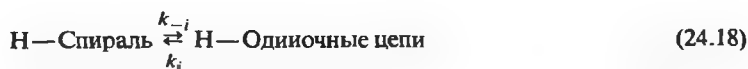
РИС. 24.23. Кинетические исследования разворачивания тРНК_f^{Met} из *E. coli*, вызываемого скачкообразным повышением температуры, в 0,17 M Na⁺. А. Дифференциальные кривые плавления под действием тепла, полученные для четырех отличных друг от друга релаксационных процессов. $\Delta A/\Delta T$ представляет собой отвечающий данному релаксационному процессу полный прирост оптической плотности в результате скачкообразного повышения температуры, поделенный на амплитуду температурного скачка. Для этих четырех отличных друг от друга релаксационных процессов удалось получить столь хорошее разрешение, несмотря на то что они происходят в перекрывающихся температурных интервалах, потому что они протекают с совершенно разными скоростями. Б. Зависимость времен релаксации, отвечающих четырем упоминавшимся в части А рисунка релаксационным процессам, от температуры. В верхней части рисунка указаны интервалы температур, внутри которых происходит регистрируемое ЯМР плавление соответствующих структурных участков рассматриваемой тРНК. Эти интервалы расположены на графике по шкале времени напротив тех значений, отвечающих характеристическим временам ЯМР, при которых происходит уширение спектральных линий за счет реакций обмена (см. основной текст). Указано также, с какими структурными участками связаны четыре вышеупомянутых релаксационных процесса. Все точки, представленные на рисунке светлыми кружочками, есть результат прямых измерений в релаксационных опытах, регистрирующих изменение оптической плотности после скачка температуры. Точки, представленные черными кружочками, отвечают значениям, полученным из условия $2\tau = 1/k_{-i}$ при $T = T_m$. Можно видеть, что результаты релаксационных опытов прекрасно экстраполируются к значениям, которые лежат в интервалах плавления, регистрируемых методом ЯМР. (Crothers et al., 1974.)

ваний. Отдельные этапы релаксационных процессов обычно не удается связать с какими-либо конкретными структурными изменениями, не получив значительного количества дополнительной информации с помощью структурных методов, обладающих более высокой разрешающей способностью.

● ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЯМР ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ СООТВЕТСТВИЯ МЕЖДУ НАБЛЮДАЕМЫМИ РЕЛАКСАЦИОННЫМИ ПРОЦЕССАМИ И СТРУКТУРНЫМИ УЧАСТКАМИ В тРНК

Изучение спектров протонного магнитного резонанса тРНК^{Met} проводили в тех же условиях, какие были использованы при исследовании релаксационных процессов. По мере повышения температуры образцов тРНК происходит избирательное уширение некоторых линий в слабопольной области спектра, приписываемых протонам, которые образуют связь типа N—H...N. Например, в интервале температур между 21 и 37°C суммарная интенсивность линий в этой части спектра уменьшается на величину, примерно равную сумме сигналов от четырех протонов. Два из них, как явствует из спектра, наблюдаются в виде отдельных линий от единичных протонов при значениях —13,65 и —11,45 м.д., и, следуя изложенной выше схеме рассуждений, их можно приписать ориентировочно протонам пар A¹¹—U²⁶ и G¹⁰—C²⁷ соответственно. Поскольку обе эти пары принадлежат спиральному участку дигидроуридиловой ветви, логично заключить, что происходит плавление всего этого участка, и локализация двух других сигналов, которые исчезают в данном интервале температур, подтверждает это. Точно так же можно установить, в каких интервалах температур происходит плавление спиральных участков ТψС-, антикодонной и акцепторной ветвей тРНК; указанные интервалы располагаются соответственно при все более высоких температурах (рис. 24.23, Б).

Чтобы связать температуру плавления, определяемую с помощью ЯМР, с временем релаксации, получаемым при регистрации оптических характеристик, необходимо учесть, что эти два метода регистрируют процессы, происходящие с весьма разными скоростями. Уширение линий в спектре ЯМР происходит, когда скорость обмена соответствующих протонов становится сопоставима с характеристическими временами ЯМР. Ситуация, вообще говоря, достаточно сложная, потому что уширение спектральных линий, соответствующих *i*-му спиральному участку, может происходить вследствие двух различных процессов. Первый — это процесс раскрытия пар оснований в спирализованном участке:



Второй процесс — это реакция обмена с растворителем:



С помощью оптических методов можно найти лишь k_i и k_{-i} , в то время как при измерениях методом ЯМР могут получиться те же величины, либо $k_{\text{обм}}$ и $k_{-\text{обм}}$, либо суперпозиция тех и других.

Некоторые предельные случаи допускают простое истолкование. Допустим, что процесс раскрытия пар в спирали протекает медленно в масштабе характерных времен ЯМР, а обмен с растворителем происходит быстро, после того как цепи в этом месте спирали разойдутся. Можно показать, что ширина линий, приписываемых протонам спаренных оснований, в области спектра от —11 до —15 м.д. определяется в этом случае величиной

k_{-i} . Если и раскрытие пар в спирали, и обмен с растворителем протекают медленно, то снова преобладает k_{-i} . Если оба этих процесса протекают быстро, то приходится учитывать время релаксации τ данного спирального участка: $\tau^{-1} = k_i + k_{-i}$. В том случае, когда $k_{\text{обм}}\tau \gg 1$, обмен протонов с водой происходит фактически всякий раз, как только спираль в данном месте раскроется, и можно показать, что ширина линии все еще определяется в основном величиной k_{-i} . Если, однако, $k_{\text{обм}}\tau \ll 1$, то доминирующим фактором становится скорость обмена с растворителем. Будем считать, что этот последний случай не реализуется ни в одном из зарегистрированных нами в тРНК переходных процессов.

Из релаксационных опытов, проводимых с использованием оптических методов, мы получаем величину k_{-i} . В высокотемпературной области соответствующего интервала плавления найденное из опыта время релаксации $\tau_{\text{опт}} = (k_i + k_{-i})^{-1}$ определяется главным образом величиной k_{-i} , поскольку в этой области $k_{-i} \gg k_i$. Однако плавление, регистрируемое оптическими методами, происходит гораздо быстрее, чем те процессы, которые приводят к исчезновению линий ЯМР. Таким образом, найденные из опыта значения k_{-i} приходится экстраполировать к временам, характерным для ЯМР. В опытах на модельных комплексах, образованных олигонуклеотидами, было найдено, что при значении $\tau_{\text{ЯМР}} = 5$ мс наблюдается взаимное соответствие между кривыми плавления, регистрируемыми методами ЯМР, и кривыми, полученными с помощью оптических методов. Представленные на рис. 23.23, Б интервалы плавления, которые определены с помощью ЯМР, расположены на оси времени именно в этой области. Нетрудно видеть, что требуется весьма значительная экстраполяция оптических данных в область времен, характерных для ЯМР. Чтобы повысить надежность такой экстраполяции в область более низких температур, мы можем поставить еще одну реперную точку на графике, используя тот факт, что при температуре, соответствующей «оптической» T_m , $k_i = k_{-i}$, так что для каждого релаксационного процесса $\tau_{\text{опт}}^{-1} = 2k_i$ при $T = T_m$. Все три времени релаксации, наблюдаемые при повышенных температурах, прекрасно экстраполируются в область более низких температур, попадая в какой-либо из интервалов, в котором, согласно ЯМР, происходит плавление того или иного структурного участка (рис. 24.23, Б). Тем самым мы установили, с каким структурным участком связан каждый релаксационный процесс, регистрируемый оптическими методами.

РАЗЛИЧНЫЕ СТАДИИ ПЛАВЛЕНИЯ тРНК

На рис. 24.22 изображены подробно различные стадии плавления тРНК_f^{Met} под действием тепла, соответствующие переходным процессам I → II и II → IV, определяемым диаграммой состояний. Посмотрим, как можно установить, что данная тРНК при плавлении проходит через эти стадии. Для плавления третичной структуры или спирального участка дигидроуридиловой ветви не было зарегистрировано оптическими методами никакой отдельной стадии плавления. Однако в последнем случае ЯМР отчетливо показывает, что протоны этого участка могут обмениваться с растворителем при довольно низких температурах. Таким образом, оказывается, что эта спираль какую-то небольшую долю времени пребывает в раскрытом состоянии за счет флуктуаций, прежде чем произойдет понимаемое в обычном смысле этого слова плавление под воздействием тепла, которое в данном случае совпадает с утратой третичной структуры. Согласно значениям энергий взаимодействия между основаниями в двойной спирали, приведенным в табл. 23.4, спиральная часть ТΨС-ветви должна быть следующим наименее стабильным участком, обладающим вторичной структурой, после спирали дигидроуридиловой ветви, что и подтверждается результатами, представленными на рис. 24.23.

Происходящий при наиболее высоких температурах переходный процесс, регистрируемый оптическими методами, приписывается превращению в спиральном участке акцеп-

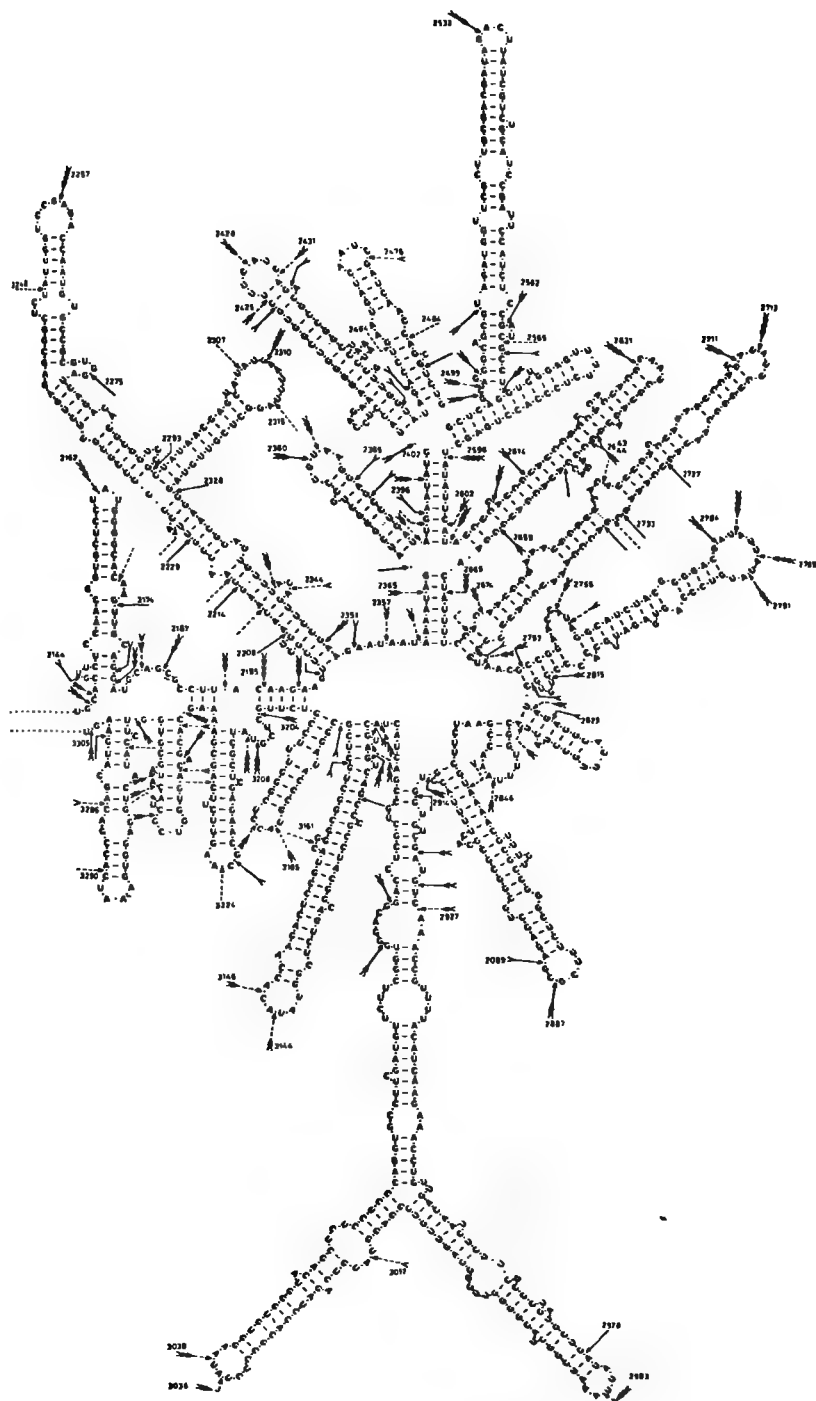
торной ветви. Заметим, что этому переходу отвечает наибольшее время релаксации по сравнению с двумя предыдущими, что уже нельзя отнести на счет третичной структуры. Однако этому имеется достаточно простое объяснение. Ниже T_m , характеризующей этот процесс, где кинетика релаксации определяется скоростью образования спирали, скорость релаксации должна быть мала, поскольку из-за того, что образование такой большой петли статистически маловероятно, эта реакция идет очень медленно. Обращает на себя внимание необычный ход температурной зависимости времени релаксации, полученный для данного переходного процесса (см. рис. 24.23). Время релаксации убывает и ниже, и выше T_m . Первый эффект, возможно, объясняется взаимосвязанностью плавления спиральных участков акцепторной и антикодонной ветвей.

В нашем рассмотрении мы полагали, что каждый переход совершается независимо от остальных, но это, конечно, слишком большое упрощение. Плавление акцепторного и антикодонного спиральных участков происходит в перекрывающихся интервалах температур. Пока спираль антикодонной ветви еще не расплавлена, она должна увеличивать скорость образования спирали акцепторной ветви, поскольку существенно сокращаются размеры петли, при которых происходит образование спирального участка в акцепторной ветви. Остается только удивляться, что не наблюдается никаких других эффектов взаимодействия. Однако это и хорошо, поскольку из-за сильной взаимосвязанности могли бы получиться другие времена релаксации, которые сложным образом зависели бы от нескольких основных времен релаксации, отвечающих отдельным спиральным участкам, и этот эффект мог бы сильно осложнить все дело, если бы мы попытались найти структурное соответствие и проанализировать тот или иной релаксационный процесс, наблюдаемый оптическими методами.

Заметим, что как раз те два обладающих вторичной структурой участка, которые оказываются наиболее стабильными в процессе плавления под воздействием тепла, остаются ненарушенными в принятой выше схеме перехода тРНК в вытянутую форму (III) при достаточно низких концентрациях соли. В противоположность им, относительная легкость плавления третичной структуры и вторичной структуры в дигидроуридиловой ветви заставляет предположить, что в зависимости от той или иной функциональной роли тРНК эти элементы структуры, возможно, участвуют в различных конформационных преобразованиях. Стоит лишний раз подчеркнуть вывод, следующий из рассмотренных нами результатов исследований плавления тРНК, который состоит в том, что эффективность различных методов значительно усиливается, если их комбинировать друг с другом. Использование ЯМР позволило подтвердить правильность косвенных соображений, на основе которых было установлено, с какими структурными участками в тРНК связаны регистрируемые оптическими методами релаксационные процессы, а результаты, полученные при регистрации плавления оптическими методами, помогли связать отдельные линии в спектре ЯМР с конкретными нуклеотидами в тРНК. Такой симбиоз различных методов, вероятно, необходим, если мы хотим установить равновесный конформационный состав и динамику конформационных изменений некоторых более сложных РНК.

ВТОРИЧНАЯ И ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРЫ БОЛЬШИХ РНК

В качестве примера того, с какими трудностями еще предстоит столкнуться исследователям, рассмотрим часть последовательности РНК бактериофага MS2, изображенную на рис. 24.24. Эта последовательность была свернута с образованием вторичной структуры так, чтобы получить максимальный энергетический выигрыш в локальном масштабе, используя известные значения энергий взаимодействий в двойной спирали и в петле; но для такой большой последовательности (как и для типичного белка) не существует пока реального способа исследовать все возможные схемы спаривания оснований, чтобы быть



участками, обладающими вторичной структурой, и весьма эффективно образуют сшивки между цепями после облучения образца ультрафиолетовым светом. Некоторые химические агенты обладают способностью образовывать мостик между двумя близко расположенными элементами одиночных цепей или между двумя близко расположенными спирализованными участками, связываясь с ними специфическим образом. Примерную локализацию сшивок вдоль молекулы можно получить, исследуя такую РНК под электронным микроскопом после тщательной денатурации. Молекулы без сшивок выглядят как вытянутые нити, а молекулы, в которых есть сшивки, образуют петли. Установив, где расположена петля, вы тем самым определите примерное положение сшивки вдоль цепи. В идеальном случае имеется принципиальная возможность установить точное положение сшивки с помощью методов быстрого определения нуклеотидной последовательности в геле.

Фундаментальный вопрос при выборе альтернативных структур РНК — это вопрос о том, как соотносятся между собой вероятность спаривания оснований, близко расположенных в последовательности (шпильки), и вероятность спаривания оснований, достаточно удаленных друг от друга в той же последовательности (петли). Образование первых выгоднее с точки зрения локальной термодинамики, но разность в свободной энергии при образовании большой петли не столь уж велика, и ее легко компенсировать образованием нескольких дополнительных GC-пар. В предварительных исследованиях на рРНК методом образования сшивок наблюдали большое количество спаренных участков, дающих большие петли. Однако общий баланс между шпильками и петлями пока неизвестен.

Краткие выводы

В отличие от открытых форм в кольцевой замкнутой двухцепочечной ДНК существуют топологические ограничения. Порядок зацепления (алгебраическое число пересечений одной цепью воображаемой поверхности, натянутой на другую цепь) должен оставаться неизменным (т.е. является топологическим инвариантом). Это приводит к тесной взаимосвязи между локальной плотностью витков двойной спирали и тенденцией ДНК образовывать сверхвитки. Оказалось, что сверхспирализация встречающихся в природе кольцевых замкнутых ДНК отрицательна и реализуется в третичной структуре в форме левых тороидальных или правых взаимно переплетенных сверхвитков, а во вторичной — в форме уменьшения плотности витков двойной спирали¹. Добавляя агент типа этидия, связывающийся с ДНК путем интеркаляции, можно постепенно снять эти сверхвитки, т.е. перевести ДНК в релаксированное состояние. Дальнейшее связывание этидия с ДНК приводит к появлению в последней положительных сверхвитков. Зная величину угла, на который раскручивается ДНК при связывании с одной молекулой этидия, можно рассчитать среднее число сверхвитков, приходящееся на молекулу ДНК в данном препарате. Молекулы ДНК с одним и тем же значением молекулярной массы, но с различным числом сверхвитков можно разделить посредством электрофореза в геле. Сверхспирализация превращает ДНК в чрезвычайно чувствительную систему, способную преобразовывать локальные структурные изменения в молекуле в значительные структурные изменения всей молекулы в целом.

¹ Какая доля сверхвитков реализуется в виде райзинга (т.е. в форме витков третичной структуры), а какая — в виде кручения (т.е. через изменение числа витков вторичной структуры) — определяется соотношением коэффициентов жесткости двойной спирали ДНК на изгиб и на кручение. Подробнее см., например, обзор Франк-Каменецкого М. Д. и Вологодского А. В., УФН, 134 № 4, с. 641 (1981). — *Прим. ред.*

В исследованиях третичной структуры РНК в растворе, объектом которых обычно служила тРНК, применялись самые разнообразные методы. С помощью спектроскопических методов можно оценить относительное содержание в молекуле спаренных оснований. ЯМР позволяет во многих случаях определить, какие именно (по расположению в нуклеотидной последовательности) основания спарены. Основания, которые не спрятаны внутри молекулы или просто принадлежат одноцепочечному участку, можно распознать путем измерения скорости обмена с тритием протона при C^8 пуринов или по способности этих оснований образовывать комплексы с комплементарными олигонуклеотидами. Общую картину того, как расположены друг относительно друга разные части молекулы, в том числе отдельные спиральные участки и петли, можно получить с помощью методов, использующих сшивание близко расположенных участков молекулы или передачу энергии возбуждения от одного люминофора в молекуле на другой. В тРНК могут происходить различные конформационные перестройки при изменении концентрации соли в растворе и температуры. Равновесное плавление в сочетании с кинетическими исследованиями позволяет построить диаграмму состояний для равновесных структур тРНК в растворе. Подробную картину того, на какие отдельные стадии разбивается процесс плавления тРНК, можно получить, исследуя, как зависят спектры ЯМР от температуры, и установив затем, с исчезновением каких линий, отвечающих спаренным основаниям, связаны регистрируемые оптическими методами релаксационные процессы, происходящие в тРНК после температурного скачка.

Задачи

24.1. Пусть кольцевая замкнутая двухцепочечная ДНК с мол. массой $6 \cdot 10^6$ находится в релаксированном состоянии, в В-форме, в обычном водном растворе.

а. Определите число и знак сверхвитков в такой ДНК после перехода ее в А-форму, произошедшего в результате добавления спирта.

б. Допустим, что та же ДНК после перехода, описанного в п. а, переводится в релаксированное состояние в присутствии спирта с помощью фермента, способного размыкать и вновь сшивать цепи ДНК. Что произойдет после того, как мы удалим этот фермент и переведем ДНК в обычный водный буфер?

24.2. В чем состоит топологическое отличие двух структур, изображенных на рис. 24.25, друг от друга? От структур И и О в Дополнении 24.2?

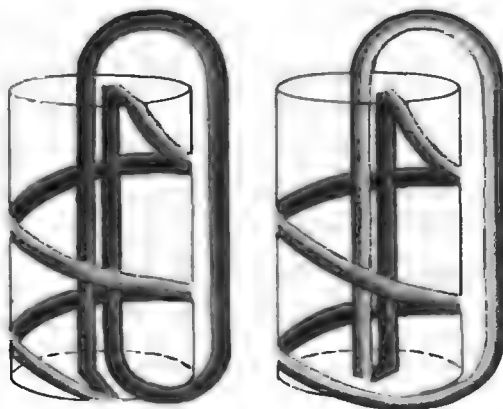


РИС. 24.25.

24.3. В растворе, содержащем ДНК, установилось равновесие между связанным и свободным бромистым этидием. Затем в раствор добавили фермент, способный разрывать и вновь соединять цепи ДНК, с тем чтобы полностью релаксировать ДНК.

а. В первом опыте было обнаружено, что количество связанного этидия уменьшилось. Определите знак сверхвитков в исходной ДНК. Допустим, что вы знаете, насколько уменьшилось количество связанного этидия; можно ли тогда рассчитать, сколько сверхвитков было в ДНК первоначально?

б. Во втором опыте нашли, что количество связанного этидия осталось прежним. Если на каждую молекулу ДНК приходится 169 молекул связанного этидия, то сколько сверхвитков и какого знака было в исходной ДНК?

24.4. Докажите, что, зная $(4N - 10)$ расстояний между местами связывания (для $N \geq 4$), можно установить взаимное расположение N таких мест в молекуле. *Задача для желающих.* Пусть вам известно, что фигура, образованная 8 точками (сайтами), обладает симметрией C_2 . Мы можем записать это схематически так: A B C D · A' B' C' D'. Найдите, какое минимальное число расстояний требуется измерить, чтобы этого хватило для построения данной фигуры. (Эта задача включена по предложению Фрэнсиса Крика.)

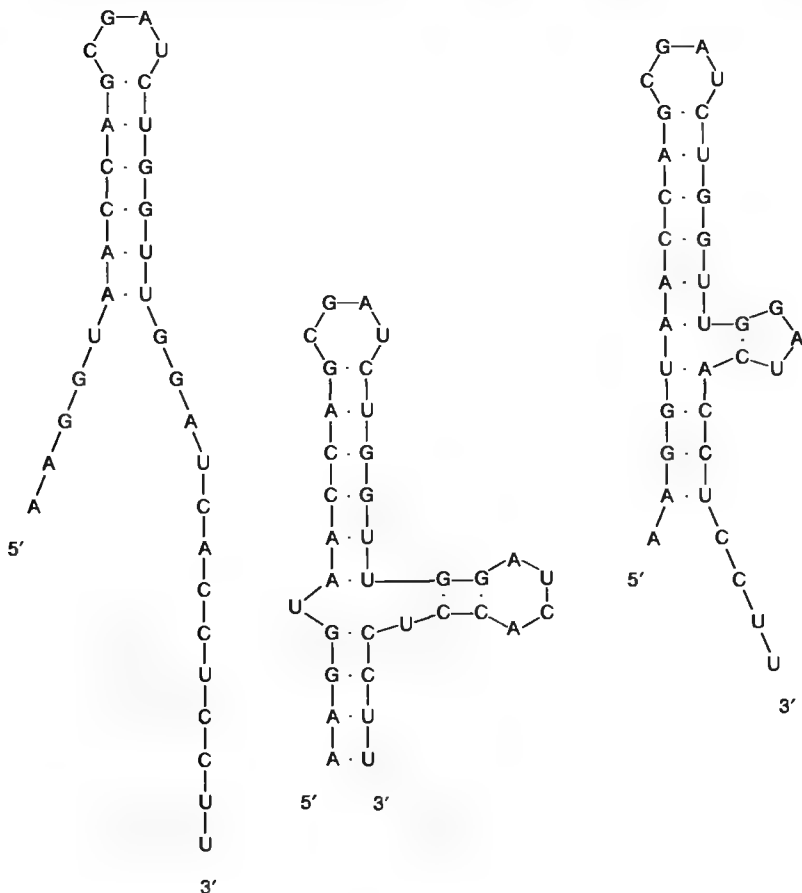


РИС. 24.26.

24.5. На рис. 24.26 изображены три структуры, предложенные для одного и того же фрагмента РНК.

а. Рассчитайте примерный спектр ЯМР на участке от -14 до -15 м.д. для каждой из этих трех структур. Сможем ли мы отличить их друг от друга, пользуясь спектрами ЯМР в этой области?

б. Назовите два тетрануклеотида, посредством которых в опытах по связыванию можно было бы точно установить, какая из этих трех структур присутствует в растворе.

в. Какой из фрагментов данной последовательности, образующихся после расщепления панкреатической РНКазой, оказался бы наиболее полезным при анализе этих структур с помощью реакций обмена с тритием протона C^8-H -группы пуринов?

г. Чем могут быть полезны кинетики релаксации указанных трех структур, если вам надо отличить эти структуры друг от друга?

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Bauer W. R., 1978. Structure and reactions of closed duplex DNA, *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, **7**, 287.
Bauer W. R., Vinograd J., 1974. Circular DNA. In: *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, vol. 2, ed. P.O.P. Ts'o, New York, Academic Press, p. 265.
Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr., 1974. *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, New York, Harper and Row.
Crothers D. M., Cole P. E., 1978. Conformational changes of tRNA. In: *Transfer RNA*, ed. S. Altman, Cambridge, MIT Press, p. 196.

Специальная

- Crick F. H. C., 1976. Linking numbers and nucleosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2639.
Crothers D. M., Cole P. E., Hilbers C. W., Shulman R. G., 1974. The molecular mechanism of thermal unfolding of *Escherichia coli* formylmethionine transfer RNA, *J. Mol. Biol.*, **87**, 63.
Dugaiczak A., Boyer H. W., Goodman H. M., 1975. Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures, *J. Mol. Biol.*, **96**, 171.
Fuller F. B., 1971. The writhing number of a space curve, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 815.
Gamble R. C., Schoemaker H. J. P., Jekowsky E., Schimmel P. R., 1976. Rate of tritium labeling of specific purines in relation to nucleic acid and particularly transfer RNA conformation, *Biochemistry*, **15**, 2791.
Hilbers C. W., Robillard G. T., Shulman R. G., Blake R. D., Webb P. K., Fresco R., Riesner D., 1976. Thermal unfolding of yeast glycine transfer RNA, *Biochemistry*, **15**, 1874.
Kearns D. R., 1976. High resolution nuclear magnetic resonance investigations of the structure of tRNA in solution. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 18, W. E. Cohn, New York, Academic Press, p. 91.
Rhodes D., 1977. Initial stages of the thermal unfolding of yeast phenylalanine transfer RNA as studied by chemical modification: the effect of magnesium, *Eur. J. Biochem.*, **81**, 91.
Riesner D., Römer R., 1973. Thermodynamics and kinetics of conformational transitions in oligonucleotides and tRNA. In: *Physico-Chemical Properties of Nucleic Acids*, vol. 2, ed. J. Duchesne, London, Academic Press, p. 237.
Robillard G. T., Tarr C. E., Vosman F., Reid B. R., 1977. A nucleic magnetic resonance study of secondary and tertiary structure in yeast tRNA^{Phe}, *Biochemistry*, **16**, 5261.
Sundaralingam M., Rao S. T., 1975. *Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions*, Baltimore, University Park Press.
Wang J. C., Davidson N., 1966. On the probability of ring closure of lambda DNA, *J. Mol. Biol.*, **19**, 469.

Глава 25 Введение в теорию установления равновесия по разные стороны мембран; структура двойных слоев.

25.1. Мембранные системы

Каждая живая клетка окружена наружной мембраной (гл. 4). Эта мембрана служит разделяющей перегородкой между содержимым клетки и внеклеточным пространством, а также играет роль посредника, благодаря которому клетка общается с окружающей средой и с другими клетками. Мембраны выполняют и другие функции; так, они образуют барьер между ядром и цитоплазмой и эндоплазматическую сеть.

Мембранные явления уже давно интересуют исследователей, и не только потому, что роль биологических мембран столь велика. Синтетические мембраны (например, из целлофана) используются в лаборатории для определения молекулярной массы различных соединений и при исследовании взаимодействия между макромолекулами и малыми молекулами. Распределение молекул по разные стороны таких мембран происходит в соответствии с термодинамическими законами, которые применимы также и к более сложным мембранам, встречающимся в биологических системах, хотя в этих последних случаях следует учитывать специфические свойства биологических мембран.

В этой главе мы сначала рассмотрим фундаментальные термодинамические законы, в соответствии с которыми происходит распределение малых молекул по разные стороны полупроницаемой мембраны, и обсудим, как с их помощью можно подойти к решению некоторых интересных проблем. Эти законы лежат в основе поведения всех полупроницаемых перегородок, в том числе и сложных биологических мембран. Затем мы рассмотрим свойства искусственных биологических мембран — фосфолипидных бислоев, с тем чтобы понять термодинамические принципы, в соответствии с которыми формируются такие слои, и чтобы установить взаимосвязь между структурой и функцией бислоев. Мы не ставим своей целью охватить сколько-нибудь существенную часть работ в этой области, а лишь суммируем основные принципы. Анализ свойств искусственных мембран поможет нам понять, как функционируют естественные биологические мембраны, о которых шла речь в гл. 4.

25.2. Установление равновесия по разные стороны мембраны

ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Основной термодинамический принцип, «управляющий» распределением диффундирующих молекул в системе с мембраной, состоит в том, что химические потенциалы данного компонента по разные стороны этой мембраны должны быть равны. Из него можно получить ряд интересных следствий.

Чтобы проиллюстрировать суть этого принципа, рассмотрим систему, в которой молекулы незлектролита D могут легко проходить через мембрану (рис. 25.1). Для обозначения соответственно первой и второй сторон мембраны мы используем верхние индексы (1) и (2). В состоянии равновесия должны выполняться соотношения



РИС. 25.1. Установление равновесия в сосуде, разделенном полупроницаемой мембраной. А. Вначале молекулы D находятся в растворе со стороны 1. Б. После установления равновесия молекулы D поровну распределяются по обе стороны мембраны.

$$\mu_D^{(1)} = \mu_D^{0(1)}(T^{(1)}, P^{(1)}) + RT \ln a_D^{(1)} \quad (25.1a)$$

$$= \mu_D^{0(2)}(T^{(2)}, P^{(2)}) + RT \ln a_D^{(2)} = \mu_D^{(2)} \quad (25.1b)$$

где μ_D и a_D — соответственно химический потенциал и активность неэлектролита¹. В общем случае равновесие устанавливается при постоянных T и P по всей системе, и тогда стандартные химические потенциалы $\mu_D^{0(1)}$ и $\mu_D^{0(2)}$ одинаковы с обеих сторон мембраны ($T^{(1)} = T^{(2)}$ и $P^{(1)} = P^{(2)}$). Следовательно,

$$a_D^{(1)} = a_D^{(2)} \quad (25.2)$$

Таким образом, D равномерно распределяется по обе стороны мембраны. Если в системе имеется много типов нейтральных молекул, которые свободно проходят через мембрану, то для каждого из них выполняются уравнения (25.1) и (25.2).

Рассмотрим теперь ситуацию, когда в растворе со стороны 2 находятся макромолекулы, причем для них мембрана непроницаема. Для любых диффундирующих нейтральных молекул выполняются равенства (25.1) и (25.2). [Строго говоря, присутствие макромолекул создает осмотическое давление, природа которого будет обсуждаться в следующем разделе, так что давление со стороны 2 чуть больше, чем со стороны 1. В этом случае $\mu_D^0(T, P^{(1)})$ и $\mu_D^0(T, P^{(2)})$ немного различаются. Однако это различие обычно не столь велико, чтобы существенно влиять на равенство (25.2).] Равенство (25.2) особенно ценно потому, что в ситуации, когда молекулы типа D связываются с макромолекулами, с его помощью, воспользовавшись результатами равновесного диализа, можно определить коли-

¹ Выражение для химического потенциала можно записать по-разному в зависимости от выбора стандартного состояния. Например, пренебрегая поправками, связанными с тем, что в формулу должны входить не концентрации, а активности, мы можем написать $\mu_D = \mu_D^0 + RT \ln(D)$, где (D) — концентрация в молях на литр. В этом случае стандартное состояние отвечает концентрации 1 моль на литр и μ_D^0 — парциальная молярная свободная энергия одномолярного раствора неэлектролита D. С другой стороны, если мы напишем $\mu_D = \mu_D^0 + RT \ln \chi_D$, где χ_D — это молярная доля D, то стандартное состояние отвечает молярной доле D, равной единице, и μ_D^0 — парциальная молярная свободная энергия D при единичной молярной доле, т.е. свободная энергия чистого D. Способ выражения μ_D через концентрацию D выбирается в зависимости от рассматриваемой задачи.

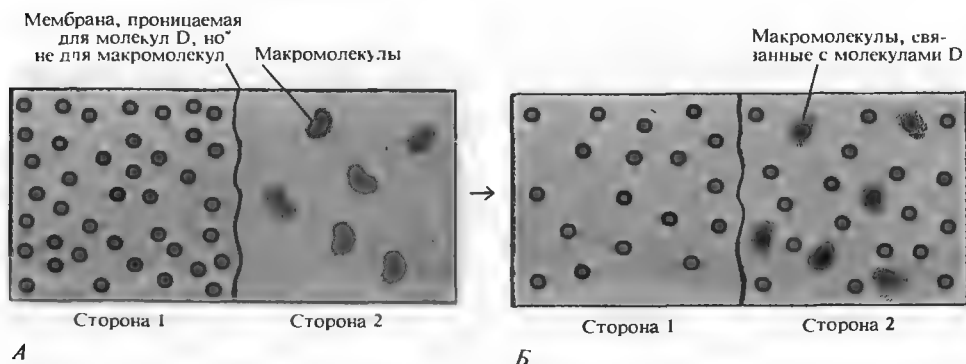


РИС. 25.2. Равновесный диализ. А. Сначала молекулы D находятся в растворе со стороны 1, а макромолекулы — в растворе со стороны 2. Б. После установления равновесия с обеих сторон мембраны находятся равные количества свободных молекул D.

чество связанного D (рис. 25.2). При этом свободно диффундирующему лиганду, способному к связыванию, позволяют прийти в равновесие, а затем производят измерения. В равновесии полная концентрация молекул D (связанных и несвязанных) со стороны 2 минус их концентрация со стороны 1 — это концентрация связанных D:

$$(D)^{(2)} + (\text{Связанные D})^{(2)} - (D)^{(1)} = (\text{Связанные D})^{(2)} \quad (25.3)$$

где для простоты мы заменили активности концентрациями (ясно, что обусловленную этим поправку тоже можно учесть). Уравнение (25.3) весьма полезно и широко применяется в различных системах для изучения взаимодействий лигандов с макромолекулами.

ТРАНСМЕМБРАННОЕ ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ

Рассмотрим систему, в которой макромолекулы находятся с одной стороны полупроницаемой мембраны и растворены в веществе, легко проходящем через мембрану (рис. 25.3). Химический потенциал растворителя $\mu_s = \mu_s^0 + RT \ln \chi_s$, где μ_s^0 — стандартный химический потенциал растворителя, а χ_s — его мольная доля. В состоянии равновесия химический потенциал растворителя должен быть одинаковым с обеих сторон мембраны. Однако со стороны мембраны, где находится чистый растворитель (сторона 1), мы имеем $\chi_s = 1$, в то время как присутствие второго компонента (макромолекул) со стороны 2 означает, что здесь $\chi_s < 1$. Как бы много растворителя ни перешло со стороны 1 на сторону 2, все равно мольные доли растворителя по обе стороны мембраны не станут равными. Следовательно, чтобы можно было достичь равновесия, стандартные химические потенциалы растворителя по разные стороны мембраны должны различаться как раз на ту величину, которая требуется, чтобы возместить разность в активности растворителя по обе стороны мембраны.

В экспериментальной установке, схематически изображенной на рис. 25.3, равновесие устанавливается после того, как часть растворителя перетечет со стороны 1 на сторону 2, так что давление в растворе на стороне 2 станет больше, чем на стороне 1, как раз настолько, чтобы обеспечить баланс химического потенциала растворителя с обеих сторон. Разность давления по обе стороны мембраны известна под названием *осмотического давления*. Как мы увидим, величина осмотического давления зависит от числа макромолекул со второй стороны мембраны. Таким образом, осмотическое давление — это коллоидное свойство.



РИС. 25.3. Осмотическое давление $\pi = P^{(2)} - P^{(1)}$ равно разности давлений с двух сторон мембраны.

Чтобы получить соотношение, связывающее осмотическое давление и экспериментально измеряемые переменные, рассмотрим выражения для химического потенциала растворителя. Опять используя верхние индексы (1) и (2) для обозначения сторон 1 и 2 и нижний индекс s для обозначения растворителя, мы получаем следующие выражения для равновесной системы при постоянной температуре:

$$\mu_s^{(1)} = \mu_s^{0(1)}(T, P^{(1)}) + RT \ln \chi_s^{(1)} \quad (25.4a)$$

и

$$\mu_s^{(2)} = \mu_s^{0(2)}(T, P^{(2)}) + RT \ln \chi_s^{(2)} \quad (25.4b)$$

$$\mu_s^{(1)} = \mu_s^{(2)} \quad (25.5)$$

Ясно, что $\chi_s^{(1)} = 1$, поэтому из уравнений (25.4) и (25.5) мы имеем

$$\mu_s^{0(2)}(T, P^{(2)}) - \mu_s^{0(1)}(T, P^{(1)}) = -RT \ln \chi_s^{(2)} \quad (25.6)$$

Уравнение (25.6) устанавливает связь между активностью растворителя с той стороны мембраны, где находятся макромолекулы [правая часть уравнения (25.6)], и разностью стандартных химических потенциалов с двух сторон мембраны [левая часть уравнения (25.6)].

Чтобы преобразовать уравнение (25.6) к более удобной форме, мы рассмотрим разбавленные растворы и предположим, что разность между $\mu_s^{0(2)}$ и $\mu_s^{0(1)}$ обусловлена исключительно различием в давлении. Таким образом, из основного термодинамического соотношения $(\partial \mu / \partial P)_T = \bar{v}$ (где $\bar{v}$ — парциальный молярный объем) получаем

$$\mu_s^{0(2)}(T, P^{(2)}) - \mu_s^{0(1)}(T, P^{(1)}) = \int_{P^{(1)}}^{P^{(2)}} \bar{v}_s^{(2)} dP \quad (25.7)$$

Так как мы имеем дело с разбавленными растворами, $\bar{v}_s^{(2)}$ можно заменить на парциальный молярный объем $\bar{v}_s$ чистого растворителя. Если мы предположим, что раствор несжимаем, и подставим $\bar{v}_s^{(2)} = \bar{v}_s$, то из (25.6) и (25.7) будем иметь

$$\pi \bar{v}_s = -RT \ln \chi_s^{(2)} \quad (25.8)$$

где π — осмотическое давление, равное $P^{(2)} - P^{(1)}$.

Уравнение (25.8) можно преобразовать к более удобному виду, если учесть, что в разбавленных растворах $\chi_s^{(2)}$ близко к единице, и поэтому логарифм можно разложить в ряд до первого члена:

$$-\ln \chi_s^{(2)} \cong 1 - \chi_s^{(2)} = \chi_2^{(2)} \quad (25.9)$$

где индекс 2 относится к макромолекулам. Пусть $\hat{c}$ — концентрация в граммах на литр, а M — молекулярная масса; тогда, учитывая, что $\hat{c}_s^{(2)}/M_s \gg \hat{c}_2^{(2)}/M_2$, получаем

$$\begin{aligned} \chi_2^{(2)} &= \frac{\hat{c}_2^{(2)}/M_2}{\hat{c}_2^{(2)}/M_2 + \hat{c}_s^{(2)}/M_s} \\ &\cong \frac{\hat{c}_2^{(2)}/M_2}{\hat{c}_s^{(2)}/M_s} \end{aligned} \quad (25.10)$$

Из уравнений (25.8)—(25.10) имеем

$$\pi = \frac{RT}{\bar{v}_s} \left(\frac{\hat{c}_2^{(2)}/M_2}{\hat{c}_s^{(2)}/M_s} \right) \quad (25.11)$$

Так как мы предположили, что раствор разбавлен, то $\hat{c}_s^{(2)}/M_s \cong \bar{v}_s^{-1}$, и поэтому уравнение (25.11) принимает вид

$$\pi = (RT/M_2)\hat{c}_2 \quad (25.12)$$

(мы опустили верхний индекс 2). Это очень важное уравнение.

Прежде чем двигаться дальше, имеет смысл оценить величину осмотического давления, создаваемого в растворе макромолекул. При комнатной температуре $RT \cong 24 \text{ атм} \cdot \text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$. Если $M_2 = 10^4$ и $\hat{c}_2 = 10 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ($= 10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$), то $\pi \cong 0,024 \text{ атм}$. В этом случае осмотическое давление составляет 1/40 часть атмосферного давления. Однако при той же величине $\hat{c}_2$, но при $M_2 = 10^6$ мы получим $\pi \cong 0,00024 \text{ атм}$. В этом случае макромолекулы создают осмотическое давление величиной лишь около 0,24 миллиатмосфер. Эти оценки дают примерное представление о диапазоне значений осмотического давления, наблюдаемом в эксперименте; они также указывают на прямую зависимость π от числа растворенных молекул в единице объема.

Для реальных растворов уравнение (25.12) является всего лишь предельной формулой. В общем случае осмотическое давление может быть представлено в виде вириального разложения по степеням $\hat{c}_2$:

$$\pi = RT(M_2^{-1}\hat{c}_2 + B\hat{c}_2^2 + \dots) \quad (25.13)$$

где B — второй вириальный коэффициент. Ясно, что выражение (25.13) переходит в (25.12) при $\hat{c}_2 \rightarrow 0$.

Когда в растворе по ту сторону мембраны, где находятся растворенные молекулы, присутствуют различные макромолекулы 1, 2, 3 и т.д., выражение (25.9) принимает вид

$$-\ln \chi_s^{(2)} \cong \chi_1^{(2)} + \chi_2^{(2)} + \chi_3^{(2)} + \dots \quad (25.14a)$$

и, как легко показать, (25.12) переходит в

$$\pi = \sum_i \pi_i \quad (25.14b)$$

где

$$\pi_i = (RT/M_i)\hat{c}_i \quad (25.14в)$$

Таким образом, полное осмотическое давление раствора — это просто сумма давлений, создаваемых каждым типом макромолекул. Результат вполне естественный, так как осмотическое давление зависит только от числа частиц.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Из выражений (25.12) и (25.13) следует, что, измеряя зависимость осмотического давления от $\hat{c}_2$, можно определить молекулярную массу данного вещества. Обычно для этого строят графики зависимости $\pi/\hat{c}_2$ от $\hat{c}_2$. В большинстве случаев такой график представляет собой прямую с наклоном, равным $RT\bar{M}$, которая пересекает ось ординат в точке RT/M_2 .

На рис. 25.4 приведены такие графики для четырех природных белков. В каждом случае экспериментальные точки ложатся на прямую, которая в исследуемом диапазоне концентраций близка к горизонтальной. Пересекаясь с осью ординат, эти прямые дают достаточно точные значения молекулярных масс исследуемых белков.

Возникает вопрос: какая именно величина молекулярной массы $\bar{M}$ получается при таком измерении для раствора молекул, гетерогенных по размеру? Чтобы ответить на него, найдем выражение для $\bar{M}$ из уравнения

$$\pi/\hat{c} = RT/\bar{M} \quad (25.15)$$

где $\hat{c}$ — суммарная концентрация растворенных молекул (т.е. $\hat{c} = \sum \hat{c}_i$). Разделив обе части уравнения (25.14б) на $\hat{c}$, получим

$$\pi/\hat{c} = \left(1/\sum_i \hat{c}_i\right) \sum_i \pi_i = \left(RT/\sum_i \hat{c}_i\right) \sum_i (\hat{c}_i/M_i) \quad (25.16)$$

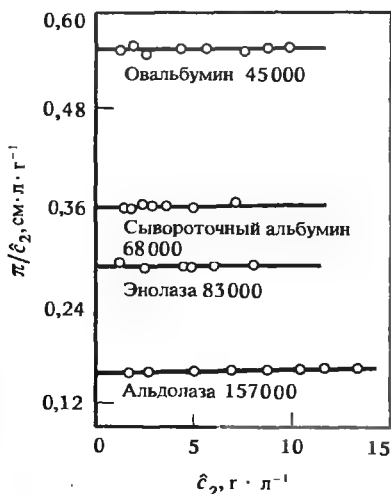


РИС. 25.4. Измерение осмотического давления для различных белков, находящихся в нативном состоянии. Указана примерная молекулярная масса белков. (Castellino F. J., Barcker R., Biochemistry, 7, 2207, 1968.)

Сравнивая уравнения (25.15) и (25.16), мы видим, что

$$\bar{M} = \left(\sum_i \hat{c}_i \right) / \sum_i (\hat{c}_i / M_i) \quad (25.17)$$

Таким образом, M — это некая средняя молекулярная масса. Если умножить каждое $\hat{c}_i$ в числителе (25.17) на M_i/M_i , то смысл M станет более очевидным:

$$\bar{M} = \left[\sum_i (\hat{c}_i / M_i) M_i \right] / \sum_i (\hat{c}_i / M_i) \quad (25.18)$$

Так как $\hat{c}_i/M_i$ — это число молей i -х растворенных молекул в единице объема, ясно, что $\bar{M}$ — это *среднечисленная* молекулярная масса ($\bar{M}_n$); именно эта величина получается при измерении осмотического давления в растворе, содержащем смесь разных типов макромолекул. Если вспомнить, что осмотическое давление зависит от числа растворенных частиц, этот результат не вызовет удивления.

ЭФФЕКТ ДОННАНА

В 1911 г. Доннан указал на важный эффект, связанный с влиянием заряженных макромолекул, находящихся по одну сторону полупроницаемой мембраны, на распределение малых ионов по разные ее стороны. Природу этого эффекта нетрудно понять.

Рассмотрим систему, содержащую заряженные макромолекулы M с зарядом z с одной стороны (сторона 2) полупроницаемой мембраны, и свободно диффундирующую соль A^+B^- , способную к диссоциации (рис. 25.5). Соль диссоциирует по схеме $AB \rightleftharpoons A^+ + B^-$, и в равновесии

$$\mu_{AB} = \mu_{A^+} + \mu_{B^-} \quad (25.19)$$

$$\mu_{AB} = \mu_{AB}^0 + RT \ln(AB) \quad (25.20a)$$

$$= \mu_{A^+}^0 + \mu_{B^-}^0 + RT \ln(A^+) + RT \ln(B^-) \quad (25.20b)$$

$$= \mu_{A^+}^0 + \mu_{B^-}^0 + RT \ln[(A^+)(B^-)] \quad (25.20в)$$



РИС. 25.5. Эффект Доннана. Ионы A^+ и B^- распределены по разные стороны мембраны неравномерно.

Уравнения (25.20б) и (25.20в) прямо следуют из уравнений (25.19) и (25.20а). Здесь мы для простоты использовали вместо активностей концентрации, но эти уравнения легко изменить так, чтобы в них фигурировали коэффициенты активности.

В равновесии должно выполняться равенство $\mu_{AB}^{(1)} = \mu_{AB}^{(2)}$. Предположим, что стандартные химические потенциалы μ_{A+}^0 и μ_{B-}^0 одинаковы с обеих сторон мембраны; тогда

$$RT \ln[(A^+)^{(1)}(B^-)^{(1)}] = RT \ln[(A^+)^{(2)}(B^-)^{(2)}] \quad (25.21a)$$

или

$$(A^+)^{(1)}/(A^+)^{(2)} = (B^-)^{(2)}/(B^-)^{(1)} = r_D \quad (25.21б)$$

где r_D — доннановское отношение. В присутствии заряженных макромолекул М это отношение может существенно отличаться от единицы, что связано с требованием электрической нейтральности¹, согласно которому

$$(A^+)^{(1)} = (B^-)^{(1)} \quad (25.22a)$$

$$(A^+)^{(2)} + z(M) - (B^-)^{(2)} = 0 \quad (25.22б)$$

Подставляя (25.21б) в (25.22б), получаем

$$(A^+)^{(1)}/r_D + z(M) - r_D(B^-)^{(1)} = 0 \quad (25.23)$$

Пусть $(s) = (A^+)^{(1)} = (B^-)^{(1)}$. [Если соль АВ полностью диссоциирована, то (s) — это общая концентрация соли в растворе со стороны 1; в противном случае (s) — это концентрация каждого типа ионов на стороне 1.] Теперь мы можем переписать соотношение (25.23) в виде

$$r_D^2 - z(M)r_D/(s) - 1 = 0 \quad (25.24)$$

Уравнение (25.24) — это квадратное уравнение относительно r_D , имеющее два корня. Так как $r_D > 0$, то физический смысл имеет лишь один из этих корней — тот, который соответствует положительному значению r_D . Тогда мы получаем по известной формуле

$$r_D = z(M)/2(s) + \{1 + [z(M)/2(s)]^2\}^{1/2} \quad (25.25)$$

Из (25.25) с очевидностью следует, что в общем случае $r_D \neq 1$, так что A^+ и B^- распределяются по разные стороны мембраны неравномерно. Такая неравномерность возникает даже несмотря на то, что система находится в равновесии, и даже при условии, что ни A^+ , ни B^- не связываются с М.

Полезно обсудить, насколько велик может быть эффект Доннана. Важным параметром, от которого зависит доннановское отношение, является величина $z(M)/2(s)$, представляющая собой отношение концентрации зарядов макромолекул к суммарной концентрации обоих типов ионов $[(A^+) + (B^-) = 2(s)]$ в растворе со стороны 1. В табл. 25.1 приведены значения r_D для разных $z(M)/2(s)$ при $z > 0$. Когда $z(M)/2(s) = 10$, получаем $r_D = 20$, так что в соответствии с уравнением (25.21б) в растворе со стороны 1 имеется 20-кратный избыток A^+ , а со стороны 2 — 20-кратный избыток B^- . Такая ситуация будет иметь место, например, если в системе присутствуют белок в концентрации 10^{-4} М с общим зарядом в расчете на молекулу +10 и одновалентная соль (например, NaCl), кон-

¹ Следует учитывать, что макромолекулы, вводимые в систему, связаны с ионами противоположного знака, т.е. находятся в нейтральной форме. Например, если заряд z на М положителен, макромолекулы могут нести с собой ионы B^- .

Таблица 25.1

ЗНАЧЕНИЯ ДОННАНОВСКОГО ОТНОШЕНИЯ r_D ДЛЯ $z > 0$

$z(M)/2(s)$	r_D
10	20,05
1	2,41
0,1	1,10
0,01	1,01

центрация которой в растворе со стороны 1 равна 50 мкМ. Однако, по мере того как (s) приближается к $z(M)$ и становится больше ее, величина r_D уменьшается до единицы. Это вполне естественно, так как в соответствии с уравнением (25.25) $r_D \rightarrow 1$ при $z(M)/2(s) \rightarrow 0$. Таким образом, эффективный способ устранения эффекта Доннана состоит в увеличении до соответствующего уровня концентрации соли.

Следует также заметить, что если $z < 0$, то перед каждым числом в первой колонке табл. 25.1 следует поставить знак «минус», а вместо соответствующих значений r_D взять обратную величину. Так, если $z(M)/2(s) = -10$, то $r_D = 0,05$. Этот пример, как и другие в табл. 25.1, просто показывает, что всегда устанавливается такое асимметричное распределение ионов, при котором малые ионы, несущие заряд того же знака (+ или -), что и макромолекулы, имеют более высокую концентрацию с той стороны мембраны, где нет макромолекул, при этом у других малых ионов соотношение концентраций обратное.

Эффект Доннана необходимо принимать во внимание во всех случаях, когда связывание ионов макромолекулами исследуется методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану, иначе доля связанных ионов от их общего количества, присутствующего с обеих сторон мембраны, будет получена с большой ошибкой.

ТРАНСМЕМБРАННАЯ РАЗНОСТЬ pH

До сих пор мы пренебрегали тем фактом, что в системе содержатся также ионы H^+ и OH^- . Обычно эти ионы присутствуют в относительно малых количествах, и то, что мы их не учитывали, не отразилось серьезным образом на результатах. Однако стоит отметить, что доннановское отношение r_D определяет не только соотношение между A^+ и B^- , но и концентрации водородных и гидроксильных ионов по обе стороны мембраны. Чтобы это продемонстрировать, заметим, что в рассматриваемой системе может образовываться кислота $HВ$, которая диссоциирует на ионы H^+ и B^- . В равновесии

$$\mu_{HВ} = \mu_{H^+} + \mu_{B^-} \quad (25.26)$$

Соотношение (25.26) полностью аналогично соотношению (25.19). Поступив таким же образом, как при выводе уравнения (25.21б), получим

$$(H^+)^{(1)}/(H^+)^{(2)} = (B^-)^{(2)}/(B^-)^{(1)} = r_D \quad (25.27a)$$

Как и ранее, можно показать, что

$$(OH^-)^{(2)}/(OH^-)^{(1)} = (A^+)^{(1)}/(A^+)^{(2)} = r_D \quad (25.27б)$$

Из уравнений (25.27a,б) или из прямого рассмотрения диссоциации молекул $НОН$ на H^+ и $ОН^-$ получаем

$$.(OH^-)^{(2)}/(OH^-)^{(1)} = (H^+)^{(1)}/(H^+)^{(2)} = r_D \quad (25.27в)$$

Таким образом, в результате присутствия заряженных макромолекул с одной стороны мембраны концентрации H^+ и OH^- по разные стороны мембраны различны.

Из уравнения (25.27a) ясно, что

$$\lg (H^+)^{(1)} - \lg (H^+)^{(2)} = \lg r_D \quad (25.28a)$$

Или, так как $pH = -\lg (H^+)$,

$$pH^{(2)} - pH^{(1)} = \lg r_D \quad (25.28b)$$

Из табл. 25.1, в которой приведены значения r_D , видно, что при очень низкой концентрации соли, когда $r_D = 20$, разность pH может быть больше единицы. Очевидно также, что эту разность pH можно устранить, если работать при достаточно высоких концентрациях соли, таких, чтобы $r_D \cong 1$.

Если система содержит много диффундирующих ионов в сравнимых концентрациях, то уравнения для условий электрической нейтральности [см. (25.22a,б)] становятся более сложными. Однако можно показать, что для каждого вида ионов X_i с зарядом z_i отношение $(X_i)^{(1)}/(X_i)^{(2)}$ постоянно, и более того — одинаково для всех видов ионов. Это отношение легко вычислить, если в системе, содержащей много разных ионов, один катион и один анион присутствуют в значительном избытке, так что в выражении для электрической нейтральности концентрацией остальных ионов можно пренебречь.

ПОЛЯРИЗАЦИЯ МЕМБРАНЫ И МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Из электрохимии хорошо известно, что неодинаковое распределение ионов приводит к появлению разности потенциалов, которая может быть измерена как электродвижущая сила. Однако если поместить электроды по разные стороны мембраны, изображенной на рис. 25.5, то мы не зарегистрируем никакой разности потенциалов. Это объясняется тем, что система находится в термодинамическом равновесии.

Хотя суммарная разность потенциалов в этом случае и равна нулю, более тщательный анализ показывает, что это имеет место только потому, что мембрана поляризована вследствие наличия градиента концентрации ионов. Для простоты предположим, что у нас опять имеется соль A^+B^- и заряженные макромолекулы M . Пусть $\Delta\Phi = \Phi^{(1)} - \Phi^{(2)}$ — разность потенциалов между стороной 1 и стороной 2; тогда

$$\Delta\Phi = 0 = \Phi_M + (RT/\mathcal{F}) \ln[(A^+)^{(1)}/(A^+)^{(2)}] \quad (25.29a)$$

$$= \Phi_M + (RT/\mathcal{F}) \ln r_D \quad (25.29b)$$

где соотношение (25.29b) следует из (25.21б), а $\mathcal{F}$ — число Фарадея ($96487 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$). Второй член в (25.29a) — это знакомое нам выражение для разности потенциалов между растворами с различной ионной активностью. Φ_M — это контактный потенциал, который возникает, когда между двумя растворами помещают насыщенный солевой мостик. В рассматриваемом случае этот потенциал известен как мембранный потенциал. Из уравнения (25.29b) следует, что

$$\Phi_M = (-RT/\mathcal{F}) \ln r_D \quad (25.30)$$

Таким образом, мембранный потенциал равен и противоположен по знаку потенциалу, создаваемому ионными градиентами. Этот результат показывает, что мембрана поляризована благодаря наличию ионных градиентов.

Разность потенциалов $(RT/\mathcal{F}) \ln r_D$ можно измерить, поместив между двумя растворами непроницаемую перегородку и соединив их солевым мостиком, например мостиком, насыщенным KCl.

Каким может быть мембранный потенциал по величине? По данным табл. 25.1, для $r_D = 20$ мембранный потенциал $\Phi_M = 77$ мВ, а для $r_D = 1,01$ величина Φ_M равна 0,26 мВ. Таким образом, мембранный потенциал может быть довольно большим; однако при достаточно высокой концентрации соли эффект Доннана в значительной мере подавляется и мембранный потенциал фактически становится равным нулю.

УСТАНОВЛЕНИЕ РАВНОВЕСИЯ ПО РАЗНЫЕ СТОРОНЫ МЕМБРАНЫ И ПЕРЕНОС ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

До сих пор мы рассматривали лишь простые полупроницаемые мембраны, используемые в эксперименте. Безусловно, термодинамические принципы, установленные для этих простых систем, должны оставаться в силе для любых мембран, в том числе и для существенно более сложных биологических мембран, выполняющих множество функций. Однако из-за сложности некоторых мембранных равновесных процессов термодинамические принципы, которые всегда справедливы, кажутся не столь очевидными.

В качестве типичного примера можно указать на тот факт, что у многих животных клеток наблюдается значительная разность концентраций Na^+ и K^+ между внутриклеточным пространством и внешней средой. Этот факт не вызывает особого удивления, если вспомнить об эффекте Доннана: так как в клетке содержится много высокомолекулярных электролитов, то вполне естественно, что малые катионы распределяются по разные стороны мембраны в соответствии с доннановским отношением. Однако в данном случае поразительно то, что K^+ имеет более высокую концентрацию с *внутренней стороны* клеточной мембраны, а Na^+ — с *наружной*. Это наблюдение противоречит простому следствию из эффекта Доннана, согласно которому отношение концентраций r_D внутри и снаружи должно быть одним и тем же для всех моновалентных катионов. Это как раз та ситуация, когда на первый взгляд кажется, что простые термодинамические соображения не выполняются.

Однако следует учитывать, что мембраны животных клеток «снабжены» $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насосом, благодаря работе которого K^+ концентрируется внутри клетки, а Na^+ выводится наружу. Этот насос приводится в действие благодаря энергии гидролиза АТФ, катализируемого $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазой. Гидролиз АТФ тесно связан с переносом ионов Na^+ и K^+ , и энергия, которая необходима для создания этих противоестественных на первый взгляд градиентов ионных концентраций, полностью определяется гидролизом АТФ. По оценкам для переноса трех ионов Na^+ и двух ионов K^+ нужно гидролизовать одну молекулу АТФ.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насос — это всего лишь одна из многих систем активного транспорта, присутствующих в биологических мембранах. Каждая из этих систем приводится в действие соответствующей термодинамически выгодной реакцией, создавая градиенты концентраций, которые сами по себе (в изолированной системе) были бы с термодинамической точки зрения невозможны. Таким образом, хотя простые термодинамические принципы, обсуждавшиеся нами раньше, выполняются всегда, в этих случаях необходимо учитывать и другие процессы, участвующие в распределении веществ по разные стороны мембраны.

25.3. Мицеллы

Основа структуры биологических мембран создается амфифильными липидными молекулами, которые, объединяясь, образуют бислойные пузырьки, имеющие полость внутри (см. рис. 4.13). Амфифильные липиды состоят из полярных головок и прикрепленных к ним длинных углеводородных «хвостов» (гл. 4). Обычно бислои образуются из двухцепочечных амфифильных молекул, т.е. молекул, у которых к одной полярной головке прикреплены две углеводородные цепи. Одноцепочечные же амфифильные молекулы образу-

ют не двойные слои, а мицеллы — глобулярные агрегаты, у которых полярные группы находятся на наружной поверхности, а углеводородные цепи направлены внутрь структуры (рис. 4.13). На этом различии в поведении одно- и двухцепочечных амфифильных молекул мы и остановимся далее в этой главе. Особенно внимательно мы рассмотрим термодинамические принципы, которые определяют образование двойных слоев, и связь между их структурой и функциями. (В гл. 4 обсуждаются общие вопросы структуры биологических мембран и роль, которую играют в ней липидные бислои.)

ОБРАЗОВАНИЕ МИЦЕЛЛ

Если в водный раствор постепенно добавлять амфифильное вещество, например додецилсульфат $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^+$, то при некоторой критической концентрации молекулы этого вещества начнут слипаться, образуя агрегаты. Это кооперативный процесс; основная масса образующихся агрегатов состоит из большого числа молекул, и лишь весьма незначительная их часть образована двумя или несколькими молекулами. Качественной иллюстрацией этого явления служит рис. 25.6, на котором приведен график зависимости фактической концентрации мономеров амфифильного вещества от суммарной концентрации вещества, введенного в раствор. Кривая имеет начальный прямолинейный участок с единичным наклоном: все вводимые молекулы переходят в раствор в виде свободных мономеров. При критической суммарной концентрации (которую называют критической мицеллярной концентрацией, КМК) концентрация свободных мономеров в растворе перестает расти. Происходит нечто вроде фазового разделения, при котором агрегаты молекул в мицеллах находятся в равновесии со свободными мономерами с почти постоянной концентрацией. По мере добавления амфифильного вещества его количество в мицеллярной фазе увеличивается, в то время как концентрация свободных мономеров растет очень медленно. (Конечно, если бы имело место настоящее фазовое разделение, концентрация мономеров после точки КМК совершенно не менялась бы.)

Образующиеся мицеллы содержат большое количество мономеров, которое зависит, в частности, от длины углеводородной цепи. Например, для *n*-алкил-бетайнов, $\text{RN}(\text{CH}_3)_2^+\text{CH}_2\text{COO}^-$, среднее число мономеров на одну мицеллу при определенных условиях меняется от 24 до 130 по мере изменения числа атомов углерода в насыщенной R-группе от 8 до 15.



РИС. 25.6. Распределение амфифильных молекул между мономерной и мицеллярной формами в зависимости от полной концентрации молекул. (Tanford C., *The Hydrophobic Effect*, New York, Wiley, 1973.)

СОДЕРЖИМОЕ МИЦЕЛЛ

Есть основание полагать, что содержимое мицелл в химическом отношении идентично чистому раствору углеводов. Эту гипотезу можно проверить разными способами. Один из путей состоит в исследовании термодинамики переноса углеводорода из воды внутрь мицеллы и сравнении ее с переносом того же углеводорода из воды в чистую жидкую углеводородную фазу. В табл. 25.2 приведены термодинамические данные по переносу трех углеводов (этана, н-пропана и н-бутана) из воды в чистый жидкий углеводород. Видно, что для каждого из этих процессов неводная фаза становится все более предпочтительной по мере увеличения длины цепи углеводорода и что перенос осуществляется благодаря благоприятному изменению энтропии, которого достаточно, чтобы с избытком компенсировать противодействующее изменение энтальпии. Эти эффекты аналогичны тем, что обсуждались в гл. 5, где рассматривались данные о свободной энергии переноса в связи с гидрофобным эффектом. Большое изменение энтропии связано с тем, что углеводород перемещается из водной в неполярную фазу, а молекулы воды высвобождаются из своего относительно связанного состояния в организованных структурах. Однако в то же самое время разрываются водородные связи между молекулами воды, что приводит к неблагоприятному изменению энтальпии.

Интересно отметить, что изменение свободной энергии для C_2H_6 составляет больше половины соответствующей величины для C_4H_{10} . Это можно объяснить тем, что изменение свободной энергии пропорционально площади углеводорода, контактирующей с водой в водной фазе. Обе группы CH_3 в C_2H_6 контактируют с водой, в то время как внутренние $-CH_2-$ группы в C_4H_{10} частично отделены от раствора. Более того, так как с увеличением длины углеводородной цепи изменение энтальпии, оставаясь положительным, существенно уменьшается, ясно, что может иметь значение форма гидратного слоя.

Наиболее важным, однако, является близость термодинамических параметров для процессов переноса внутрь мицеллы и в раствор чистого углеводорода. Изменение свободной энергии, энтальпии и энтропии несколько меньше для переноса углеводорода в додецилсульфатную мицеллу, но тенденции этих изменений для обоих процессов одинаковы. Относительно небольшое различие термодинамических параметров в этих двух случаях, вероятно, объясняется стерическими ограничениями, имеющими место в мицеллярных структурах. Например, углеводороды, оказавшиеся вблизи поверхности мицеллы, могут быть менее свободными, чем те, что находятся в области центра, или те, которые переносятся в чистую жидкую фазу; кроме того, они могут частично контактировать с упорядоченным водным слоем. Эти эффекты должны привести к меньшим изменениям энтропии

Таблица 25.2

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕНОСА УГЛЕВОДОРОДОВ ИЗ ВОДЫ
ВНУТРЬ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТНОЙ МИЦЕЛЛЫ И ИЗ ВОДЫ В ЧИСТЫЙ ЖИДКИЙ УГЛЕВОДОРОД¹

Углеводород	Вода → Мицелла			Вода → Чистый жидкий углевод		
	ΔG^0 , ккал·моль ⁻¹	ΔH^0 , ккал·моль ⁻¹	ΔS^0 , кал·град ⁻¹ · моль ⁻¹	ΔG^0 , ккал·моль ⁻¹	ΔH^0 , ккал·моль ⁻¹	ΔS^0 , кал·град ⁻¹ · моль ⁻¹
Этан	-3,45	+2,0	+18,3	-3,9	+2,5	+21
Пропан	-4,23	+1,0	+17,5	-4,9	+1,7	+22
Бутан	-5,13	0,0	+17,2	-5,9	+0,8	+23

¹ Tanford C. The Hydrophobic Effect, New York, Wiley, 1973, pp. 18, 38.

и энтальпии для переноса внутрь мицеллы, что согласуется с экспериментальными данными. Несмотря на небольшие различия, о которых шла речь, все эти данные ясно указывают на то, что содержимое мицеллы сходно по своим свойствам с жидкой углеводородной фазой. Это заключение подтверждается также и другими фактами.

ПРИНЦИП ПРОТИВОДЕЙСТВУЮЩИХ СИЛ И ОБРАЗОВАНИЕ МИЦЕЛЛ

Весьма информативным является такой термодинамический параметр, как $\mu_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$, где $\mu_{\text{мц}}^0$ — химический потенциал амфифильного вещества в мицелле, а $\mu_{\text{в}}^0$ — химический потенциал того же вещества в водной фазе. Для *n*-алкилбетаинов этот параметр меняется в зависимости от числа атомов углерода в цепи *R* амфифильной молекулы по формуле

$$\mu_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0 = 2514 - 709N_{\text{C}} \quad (25.31)$$

Если взять амфифильное вещество с другой полярной головкой, например $R-(\text{OCH}_2\text{OCH}_2)_6\text{OH}$ (алкилгексаоксигликольмоноэфир), то коэффициент при N_{C} фактически останется тем же, а свободный член в (25.31) станет существенно меньше. Таким образом, полярная головка влияет только на один из двух этих параметров. Важно отметить также, что изменение $\mu_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$ в зависимости от N_{C} ($\cong -700 N_{\text{C}}$) несколько меньше, чем то, которое наблюдается при переносе углеводородов переменной длины из воды внутрь мицеллы (табл. 25.2).

Эти и другие факты были объяснены Тэнфордом (С. Tanford, 1973) с помощью *принципа противодействующих сил*. Его идея проста. Структура и свойства мицелл определяются в основном двумя факторами: гидрофобным притяжением углеводородных цепей и взаимным отталкиванием полярных головок. Наличие сил отталкивания для амфифильных молекул, обладающих полярными головками с нескомпенсированным зарядом, совершенно очевидно. Однако помимо этого имеет место и эффект сольватации, который играет главную роль в случае нейтральных головок: толстые сольватные слои вокруг головок препятствуют их сближению.

Мы можем рассмотреть эти два фактора по отдельности, выразив $\mu_{\text{мц}}^0$ в виде

$$\mu_{\text{мц}}^0 = U_{\text{мц}}^0 + W_{\text{мц}}^0 \quad (25.32)$$

где член $U_{\text{мц}}^0$ ответствен за притяжение, а $W_{\text{мц}}^0$ — за отталкивание. Следовательно,

$$\mu_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0 = U_{\text{мц}}^0 + W_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0 \quad (25.33)$$

Величина $U_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$ примерно равна $\mu_{\text{НС}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$, изменению свободной энергии при переносе углеводорода из воды в чистый жидкий углеводород. Для $-\text{CH}_2$ -группы $\mu_{\text{НС}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$ составляет около -800 кал·моль $^{-1}$; для концевой $-\text{CH}_3$ -группы -2000 кал·моль $^{-1}$. В мицелле одна или две $-\text{CH}_2$ -группы, ближайшие к поверхности, вносят незначительный вклад в $U_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$, так как они контактируют с водой, окружающей полярную головку. Кроме того, $-\text{CH}_2$ -группы, лежащие глубже (но все же недалеко от поверхности мицеллы), в какой-то степени стерически стеснены и тоже вносят меньший вклад в $U_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$, чем группы, расположенные в глубине мицеллы. Следовательно, из $N_{\text{C}} - 1$ $-\text{CH}_2$ -групп реально только от $N_{\text{C}} - 3$ до $N_{\text{C}} - 5$ групп должны вести себя так же, как углеводород в жидком состоянии. Точное их число зависит от природы полярной головки и от ее влияния на локальную геометрию поверхности мицеллы. Имея в виду все это, получаем

$$U_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0 = (\text{от } N_{\text{C}} - 3 \text{ до } N_{\text{C}} - 5)(-800) - 2000 = (\text{от } 400 \text{ до } 2000) - 800N_{\text{C}} \quad (25.34)$$

Член, отвечающий электростатическому отталкиванию, $W_{\text{мц}}^0$, вносит положительный вклад в $\mu_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$. Нетрудно объяснить его влияние на коэффициент при N_{C} . Так как с рос-

том N_C размер мицеллы увеличивается, а с увеличением размера мицеллы расстояние между головками уменьшается (см. следующий раздел), то $dW_{\text{мц}}^0/dN_C > 0$. Таким образом, вместо $-800 N_C$ мы имеем меньшую величину, равную примерно $-700 N_C$ (в присутствии соли).

Принцип противодействующих сил дает разумное объяснение увеличению среднего размера мицеллы с ростом N_C . Чем больше N_C , тем больше член, ответственный за притяжение; это означает, что для того, чтобы прекратился рост мицеллы, необходимо более сильное отталкивание. Вклад отталкивания тем значительнее, чем крупнее мицелла, так как при этом более тесно сближаются полярные головки (см. следующий раздел), а это в свою очередь повышает $W_{\text{мц}}^0$ до такой величины, когда дальнейший рост мицеллы становится невыгодным.

ФОРМА И ВЕЛИЧИНА МИЦЕЛЛ

Малые мицеллы имеют низкую характеристическую вязкость, типичную для примерно сферических частиц. У больших мицелл характеристическая вязкость весьма значительна, что указывает на их асимметричную форму. Таким образом, крупные мицеллы в значительной мере асимметричны, а мелкие имеют примерно сферическую форму. Природа этого свойства мицелл была объяснена Тэнфордом на основе простых геометрических образов и принципа противодействующих сил.

У мицеллы, содержащей $N_{\text{ц}}$ цепей, объем «сердцевины» V (в $\text{\AA}^3$) равен

$$V = (27,4 + 26,9 N'_C)N_{\text{ц}} \quad (25.35)$$

где N'_C — число атомов углерода амфифильной молекулы, находящихся в жидкой углеводородной сердцевине и поэтому не подверженных поверхностным эффектам; отсюда $N'_C < N_C$. Уравнение (25.35) основано на данных по измерению объема, но его можно вывести (получив практически те же параметры), используя литературные данные о плотности жидких углеводородов. Помимо соотношения (25.35), налагающего ограничения на объем мицеллы, есть еще одно ограничение на геометрию и величину мицеллы — это максимальная протяженность l_{max} амфифильной цепи, которая является верхним пределом одного из размеров сердцевины. Величина l_{max} (в $\text{\AA}$) равна¹

$$l_{\text{max}} = 1,5 + 1,26 N'_C \quad (25.36)$$

Если l — радиус сферической мицеллы, то ясно, что $l \leq l_{\text{max}}$; для эллипсоидальной мицеллы с большой полуосью a и малой полуосью b имеем $b \leq l_{\text{max}}$. Предположим, что $l = l_{\text{max}}$; тогда с помощью формулы для вычисления объема шара радиуса l_{max} ($V = 4\pi l_{\text{max}}^3/3$) и уравнений (25.35) и (25.36) мы можем однозначно определить максимальную величину $N_{\text{ц}}$ для любого N'_C . Аналогично для эллипсоида с заданным отношением осей при $b = l_{\text{max}}$ мы можем найти максимальное $N_{\text{ц}}$ для любого N'_C .

В табл. 25.3 приведены результаты таких вычислений для разных N'_C в случае сферы и вытянутых эллипсоидов с отношениями осей 1,25 и 2,0. Ясно, что число амфифильных молекул на мицеллу увеличивается по мере роста l_{max} вслед за увеличением N'_C . Эту зави-

¹ Если цепь полностью вытянута и имеет плоскую зигзагообразную конфигурацию, то расстояние между соседними атомами углерода равно примерно 2,53 $\text{\AA}$, или около 1,26 $\text{\AA}$ на один углеродный атом. Считая, что концевая метильная группа увеличивает длину на 2,1 $\text{\AA}$, и предположив, что половина длины связи первого атома углерода расположена вне сердцевины, получим

$$\begin{aligned} l_{\text{max}} &\cong 2,1 + 0,63 + (1,26)(N'_C - 1) \\ &\cong 1,5 + 1,26 N'_C \end{aligned}$$

Таблица 25.3

МАКСИМАЛЬНОЕ ЧИСЛО ЦЕПЕЙ В МИЦЕЛЛАХ ^{1),2)}

Форма мицеллы	N'_C				
	6	10	12	15	20
Сфера ($l = l_{\max}$) ³⁾	17	40	56	84	143
Вытянутые эллипсоиды ($b = l_{\max}$) $a/b = 1,25$	21	50	70	105	178
$a/b = 2,0$	33	80	111	167	285

¹⁾ Tanford C. The Hydrophobic Effect, New York, Wiley, 1973, p. 76.²⁾ Для одноцепочечных амфифильных молекул N_{Π} равно числу головок N_r , для двухцепочечных молекул $N_{\Pi} = 2N_r$.³⁾ Получить сферическую мицеллу с $l = l_{\max}$ физически невозможно, поэтому значения N_{Π} для реальных сферических мицелл меньше тех, что приведены в таблице.

симость легко понять. Например, в случае сферы объем мицеллы увеличивается как $(N'_C)^3$ ($\propto l_{\max}^3$), в то время как объем, приходящийся на молекулу, (V/N_{Π}) , — это линейная функция N'_C [см. формулу (25.35)]. Следовательно, в случае сферических мицелл величина N_{Π} должна изменяться как квадрат N'_C . Более того, при заданном N'_C эллипсоидальная мицелла может содержать больше молекул, чем сферическая, и величина N_{Π} , которая при этом получается, тем больше, чем больше отношение осей (асимметрия) эллипсоида. Эти особенности — простое следствие того, что объем вытянутого эллипсоида больше, чем объем шара с радиусом, равным малой полуоси эллипсоида, и того, что с удлинением эллипсоида с фиксированной полуосью b его объем увеличивается.

ОТНОШЕНИЕ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ МИЦЕЛЛЫ К ЧИСЛУ ГОЛОВОК

Величина и форма, которые на самом деле принимает мицелла, определяются отношением площади ее поверхности A_{Π} (содержащей головки) к числу N_r головок в мицелле (для одноцепочечных амфифильных молекул $N_r = N_{\Pi}$). Такая зависимость обязана важной роли, которую играет компонент отталкивания W_{Π}^0 в регуляции роста мицеллы: ясно, что величина W_{Π}^0 зависит от расстояния между головками. Если мицелла должна вырасти сверх размера, допускаемого сферической формой, она обязана принять другую форму. Однако при таком изменении формы меняется отношение A_{Π}/N_r , причем, как мы увидим дальше, оно становится меньше. Это в свою очередь вызывает увеличение W_{Π}^0 , которое в конечном счете может ограничить рост мицеллы.

Уменьшение A_{Π}/N_r с увеличением размера мицеллы легко продемонстрировать на примере сферических и эллипсоидальных мицелл и плоских бислоев (рис. 25.7). Предположим, что для всех трех форм объем равен $V \cong \beta N'_C N_{\Pi}$, $a l = \alpha N'_C$, где α и β — константы [эти соотношения аналогичны формулам (25.35) и (25.36), когда член, зависящий от N'_C , существенно превосходит постоянный член]. Для сферы имеют место следующие соотношения:

$$A_{\Pi} = 4\pi l^2 = 4\pi \alpha^2 (N'_C)^2 \quad (25.37a)$$

$$V = \beta N'_C N_{\Pi} = (4/3)\pi \alpha^3 (N'_C)^3 \quad (25.37b)$$

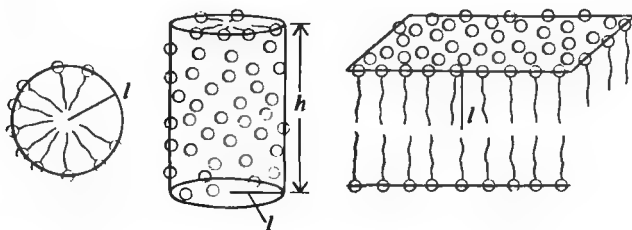


РИС. 25.7. Сферическая и цилиндрическая формы и плоский бислой.

Следовательно,

$$N_{\text{ц}} = (4/3)\pi\alpha^3(N'_C)^2/\beta \quad (25.37\text{в})$$

и

$$A_{\text{ц}}/N_{\text{ц}} = 3\beta/\alpha \quad (25.37\text{г})$$

Для длинного цилиндра, где h — его высота, пренебрегая площадью «концов», имеем

$$A_{\text{ц}} = 2\pi lh = 2\pi\alpha N'_C h \quad (25.38\text{а})$$

$$V = \pi l^2 h = \pi\alpha^2(N'_C)^2 h = \beta N'_C N_{\text{ц}} \quad (25.38\text{б})$$

Следовательно,

$$N_{\text{ц}} = \pi\alpha^2 N'_C h / \beta \quad (25.38\text{в})$$

и

$$A_{\text{ц}}/N_{\text{ц}} = 2\beta/\alpha \quad (25.38\text{г})$$

Для широкого плоского бислоя, пренебрегая площадью «краев», имеем

$$A_{\text{п}} = 2(V/2l) = \beta N'_C N_{\text{ц}} / \alpha N'_C \quad (25.39\text{а})$$

$$A_{\text{п}}/N_{\text{ц}} = \beta/\alpha \quad (25.39\text{б})$$

В каждом случае $A_{\text{п}}/N_{\text{ц}} = A_{\text{п}}/N_{\text{г}}$ для одноцепочечных амфифильных молекул и $2A_{\text{п}}/N_{\text{ц}} = A_{\text{п}}/N_{\text{г}}$ для двухцепочечных амфифильных молекул.

При данном l цилиндрическая мицелла или плоский бислой могут включить в себя любое число амфифильных молекул благодаря простому росту на концах. Однако приведенные выкладки показывают, что при заданном l наблюдается уменьшение площади поверхности в расчете на головку, когда мицелла принимает несферическую форму, что связано с необходимостью включения большего числа молекул. В общем случае отклонения от сферической формы вызывают уменьшение $A_{\text{п}}/N_{\text{г}}$, так как при заданном радиусе сфера имеет наибольшее отношение поверхности к объему.

Эта ситуация графически представлена на рис. 25.8, где изображена зависимость $A_{\text{п}}/N_{\text{г}}$ от $N_{\text{ц}}$ для одноцепочечных амфифильных молекул с $N'_C = 12$. Площадь поверхности вычислялась на расстоянии $2 \text{ \AA}$ над поверхностью сердцевины, чтобы получить более точное представление о площади, занимаемой головками на самом деле. Следует отметить, что при радиусе l_{max} мицелла правильной сферической формы имеет объем $(4/3)\pi l_{\text{max}}^3$. При фиксированном N'_C это означает, что сферическая форма достигается при одном определенном значении $N_{\text{ц}}$ ($N_{\text{ц}} = 56$; см. табл. 25.3). При больших $N_{\text{ц}}$ по мере связывания

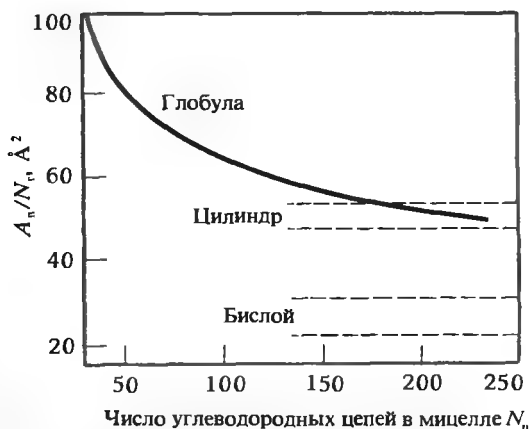


РИС. 25.8. Зависимость площади поверхности, приходящейся на одну головку, от числа углеводородных цепей в мицелле. (Ganford C., J. Phys. Chem., **76**, 3020, 1972.)

все большего и большего числа углеводородных цепей мицелла принимает эллипсоидальную форму. При построении кривой значительная часть точек была получена в предположении, что полуось b эллипсоида равна $l_{\max}$. Ясно, что при этом не составляет труда вычислить A_n/N_n для любого N_n .

Некоторые дополнительные точки были получены в предположении, что могут образоваться также мицеллы сферической формы с радиусом меньше $l_{\max}$ и эллипсоиды с полуосью b меньше $l_{\max}$. Уменьшение радиуса сферы или длины полуоси b эллипсоида с фиксированным отношением осей приводит к увеличению отношения поверхности к объему и соответственно к увеличению A_n/N_n .

У цилиндров и двойных слоев A_n/N_n не зависит от N_n , если пренебречь краевыми эффектами. Результаты вычислений представлены на рисунке пунктирными прямыми для цилиндров максимального радиуса ($l_{\max}$, нижняя пунктирная прямая) и несколько меньшего радиуса (верхняя пунктирная прямая); аналогичные результаты приведены и для двойных слоев.

Данные, представленные на рисунке, показывают, что при малых N_n легко образуются мицеллы глобулярной формы. Среднее значение N_n для глобулярных мицелл составляет около 100. С увеличением N_n A_n/N_n уменьшается, так как глобулярная структура становится все более асимметричной. В какой-то момент A_n/N_n достигает величины, характерной для цилиндрической формы. Тогда эта форма становится предпочтительной, так как цилиндрические мицеллы могут продолжать расти без дальнейшего изменения A_n/N_n . Величина A_n/N_n у плоского бислоя еще меньше, чем у цилиндра. Это приводит к весьма сильному сближению головок, и поэтому в случае одноцепочечных амфифильных молекул перехода к плоскому бислою не происходит. Этот вывод согласуется с экспериментальными наблюдениями.

ОБРАЗОВАНИЕ БИСЛОЕВ

Для двухцепочечных амфифильных молекул — таких, как фосфолипиды — ситуация существенно отличается от той, которая имеет место в случае одноцепочечных амфифильных молекул. У двухцепочечных молекул $N_n = N_{\text{Г}}/2$. График, приведенный на рис. 25.8, относится к одноцепочечным амфифильным молекулам, и, чтобы получить соответствующие величины для двухцепочечных молекул, мы должны умножить те значения, которые дает график, на два. В результате величина A_n/N_n для двойного слоя, образованного двухцепочечными молекулами, оказывается близкой к той, которая характерна

для цилиндра из одноцепочечных молекул. Поскольку, как мы видели на примере больших мицелл из одноцепочечных амфифильных молекул, такая величина A_n/N_f вполне допустима, нет оснований думать, что она окажется неприемлемой для двухцепочечных молекул. Следовательно, двухцепочечные амфифильные молекулы должны образовывать двойные слои. Несмотря на то что, если бы двухцепочечные молекулы образовывали цилиндры, величина A_n/N_f была бы еще больше, цилиндры в этом случае не могут образовываться, поскольку при таком большом расстоянии между головками в углеводородную сердцевину проникала бы вода. Более того, так как для двухцепочечных молекул величина $U_{\text{мц}}^0 - \mu_{\text{в}}^0$ примерно на 60% более отрицательна, чем для одноцепочечных, в случае двухцепочечных амфифильных молекул головки могут располагаться плотнее, чем это допустимо для одноцепочечных молекул.

Этим объясняется то, что в водных дисперсиях двухцепочечные амфифильные молекулы образуют двойные слои. Последние часто имеют вид замкнутых пузырьков, при этом углеводородные концы молекул не соприкасаются с раствором. У таких пузырьков площадь поверхности лишь незначительно отличается от площади плоского бислоя.

На процесс образования и структуру бислоя влияют катионы; это объясняется, в частности, тем, что катионы могут взаимодействовать с отрицательно заряженными головками. Так, в случае биологических мембран существенными оказываются ионы Ca^{2+} . Свидетельством тому служат исследования, в которых показано, что Ca^{2+} вызывает конденсацию фосфолипидов и ограничивает их движение.

25.4. Структура и функции двойных слоев

До сих пор в центре нашего внимания были термодинамические аспекты образования мицелл и двойных слоев. Чтобы получить представление о структуре бислоя на молекулярном уровне и установить ее связь с функциями мембраны, необходимо использовать структурные и кинетические методы, которые позволяют понять особенности упаковки отдельных углеводородных цепей и их динамических свойств. Наиболее ценными методами являются рентгеноструктурный анализ, ЭПР и ЯМР. Результаты, полученные этими методами, позволили построить достаточно детальную модель липидных бислоев, которая лежит в основе наших представлений о функционировании природных биологических мембран. (В гл. 4 описана структура фосфолипидов, о которых пойдет речь ниже.)

ДАННЫЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

Ценная информация о структуре ориентированных би- и мультислоев была получена М. Уилкинзом и др. Особый интерес представляют данные по рассеянию на дипальмитиллецитиновых мультислоях при разной степени гидратации (явления рассеяния и дифракции обсуждаются в гл. 13 и 14). Под прямым углом к дифракционным пятнам, отвечающим слоистой структуре, наблюдаются резкие дифракционные максимумы, соответствующие расстоянию $4,2 \text{ \AA}$, причем картина не зависит от степени гидратации. Этот результат напоминает данные, полученные для упорядоченного множества гексагонально упакованных углеводородных цепей (например, в парафиновых пленках). Такое сходство дифракционных картин указывает на одинаковый характер упаковки цепей в этих двух случаях.

На рис. 25.9 показан результат Фурье-синтеза (данных по дифракционному рассеянию) поперек лецитинового бислоя во влажном и сухом состоянии. Распределение электронной плотности вычислено относительно электронной плотности для воды. Указано положение отдельных групп. Видно, что расстояние между головками с ростом степени гидратации увеличивается. Минимум в распределении электронной плотности в отрицательной

РИС. 25.9. Фурье-синтез распределения электронной плотности поперек лецитинового бислоя. Сплошная линия — спектр для влажного состояния, пунктирная — для сухого. (Levine Y. K. et al., Nature, 220, 577, 1968.)

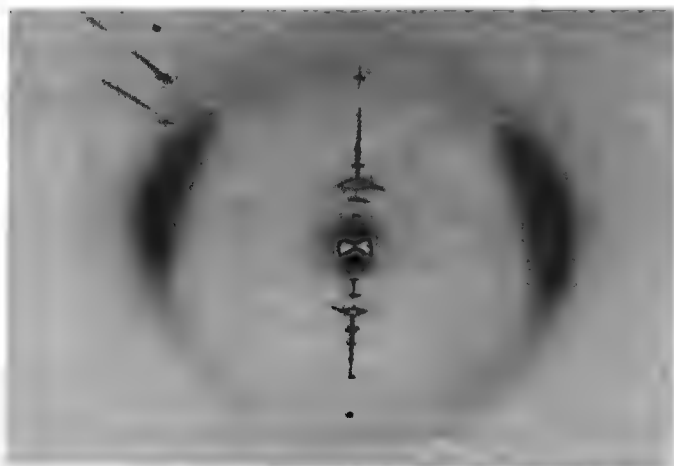
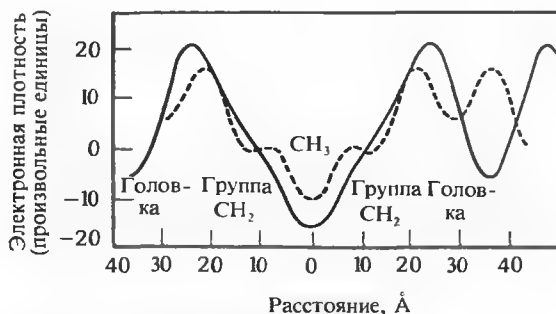


РИС. 25.10. Рентгенограмма мультислоев из лецитина яйца. Резкие меридианальные дуги появляются в результате дифракции на поверхностях слоев. Экваториальные пятна соответствуют дифракции на углеводородных цепях, разделенных расстоянием 4,6 Å. (Levine Y. K., Wilkins M. H. F., Nature New Biology, 230, 69, 1971.)

области соответствует концевой — CH_3 -группе, электронная плотность которой, как известно, меньше, чем у воды. Эти данные показывают, что концевые метильные группы расположены в середине бислоя. Группы — CH_2 проявляются на графике в виде плеча; это плечо становится более заметным в случае фурье-синтезов высокого разрешения, при этом минимум, отвечающий группе — CH_3 , также становится более резким. Все эти данные указывают на то, что углеводородные цепи противоположащих слоев слабо проникают в пространство друг между другом и что они ориентированы перпендикулярно поверхности бислоя. Благодаря такой ориентации площадь поверхности бислоя, приходящаяся на одну фосфолипидную молекулу, лишь незначительно превышает площадь сечения двух вытянутых углеводородных цепей.

Еще более информативными оказались эксперименты на ориентированных бислоях из лецитина яйца в присутствии холестерина и без него (молярное отношение 1:1). На рис. 25.10 приведена дифракционная картина, полученная на лецитиновых мультислоях. Резкие меридианальные дуги появляются вследствие дифракции на поверхностях слоев;

под прямым углом к ним видна широкая диффузная экваториальная полоса, соответствующая углеводородным цепям, которые расположены на расстоянии 4,6 Å друг от друга. Из рисунка следует, что цепи ориентированы под прямым углом к поверхности слоев.

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА УПОРЯДОЧЕНИЕ ЦЕПЕЙ

Более точное представление о расположении углеводородных цепей дают рис. 25.11 и 25.12, на которых приведено угловое распределение интенсивности дифракционной полосы, отвечающей углеводородным цепям, от экватора (0°) до меридиана (90°) в отсутствие (рис. 25.11) и в присутствии (рис. 25.12) холестерина. На каждом рисунке приведены данные для двух разных значений степени гидратации. Во всех случаях наблюдается значительное уменьшение интенсивности по мере приближения к меридиану. Очевидно, цепи в основном ориентированы перпендикулярно, а не параллельно поверхности.

Отметим, что падение интенсивности более существенно в присутствии холестерина, чем в его отсутствие, откуда следует, что холестерин способствует большему упорядоче-

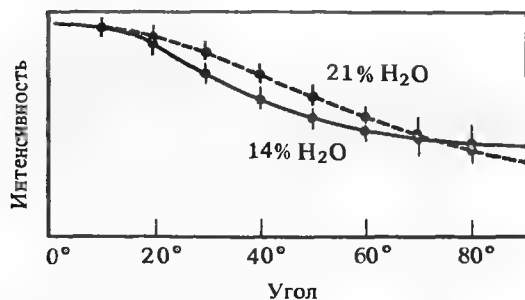


РИС. 25.11. Угловое распределение интенсивности дифракционной полосы, соответствующей углеводородным цепям бислоя из яичного лецитина. Показано изменение интенсивности дифракционной полосы, отвечающей расстоянию 4,6 Å, проинтегрированной по радиусу от экватора (0°) до меридиана (90°). (Levine Y. K., Wilkins M. H. F., *Nature New Biology*, **230**, 69, 1971.)

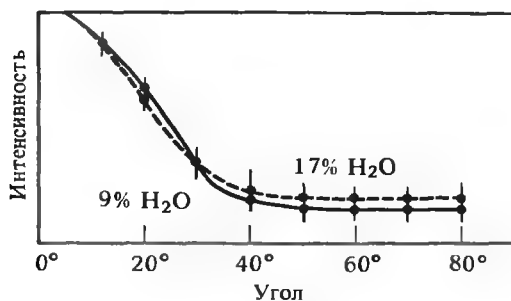
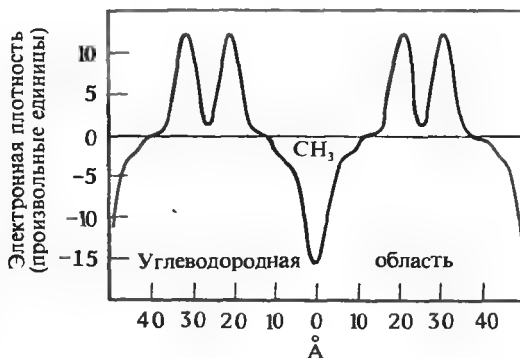


РИС. 25.12. Угловое распределение интенсивности дифракционной полосы, соответствующей углеводородным цепям бислоя из яичного лецитина в присутствии холестерина. Показано изменение интенсивности дифракционной полосы, отвечающей расстоянию 4,75 Å, проинтегрированной по радиусу от экватора (0°) до меридиана (90°). (Levine Y. K., Wilkins M. H. F., *Nature New Biology*, **230**, 69, 1971.)

РИС. 25.13. Фурье-синтез электронной плотности поперек бислоя из яичного лецитина при относительной влажности 57%. (Levine Y. K., Wilkins M. H. F., Nature New Biology, **230**, 69, 1971.)



РИС. 24.14. Фурье-синтез электронной плотности поперек бислоя из яичного лецитина и холестерина при относительной влажности 57%. (Levine Y. K., Wilkins M. H. F., Nature New Biology, **230**, 69, 1971.)



нию цепей. С другой стороны, ясно, что по крайней мере в отсутствие холестерина с повышением степени гидратации происходит разупорядочение цепей.

Влияние холестерина также ясно из фурье-синтеза электронной плотности в направлении, перпендикулярном плоскостям бислоев. На рис. 25.13 и 25.14 приведены результаты синтеза в отсутствие и в присутствии холестерина соответственно. В отсутствие холестерина впадина, отвечающая группе $-\text{CH}_3$, весьма широкая, что указывает на значительную подвижность этих групп в середине бислоя. В присутствии холестерина наблюдается более резкая впадина, что указывает на значительно меньшую свободу в перемещении $-\text{CH}_3$ -групп. Этот факт также свидетельствует об упорядочивающем действии холестерина на углеводородные цепи.

В условиях, в которых проводились рассмотренные выше эксперименты, углеводородные цепи находились в жидкокристаллическом состоянии. В бислоях происходит фазовый переход между низкотемпературным гелеобразным упорядоченным состоянием и высокотемпературным жидкокристаллическим (мы рассмотрим этот переход в следующем разделе). Как правило, холестерин упорядочивает жидкокристаллическое состояние, а когда его добавляют в бислой, находящийся в гелеобразном состоянии, он оказывает разупорядочивающее действие. Каковы бы ни были детали поведения холестерина, ясно, что он влияет на структуру бислоя.

ДАННЫЕ ЭПР

Много новых данных о структуре бислоев было получено с помощью метода ЭПР (гл. 9). Сигнал ЭПР дает только неспаренный электрон, поэтому у фосфолипидного бислоя спектр ЭПР обычно отсутствует. Можно, однако, ввести в бислой спиновые мет-

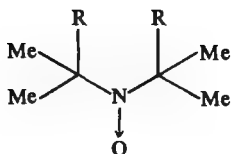


РИС. 25.15. Нитроксидный радикал.

ки — молекулы, содержащие неспаренный электрон; спектр ЭПР этих молекул существенно меняется при изменении структуры бислоя и динамических условий.

Наиболее часто используемые парамагнитные зонды — это нитроксидные радикалы (рис. 25.15). В спектре ЭПР одного из этих соединений обычно наблюдаются три линии (рис. 9.29) — результат сверхтонкого расщепления из-за взаимодействия электрона с ядром атома азота. (Спиновое квантовое число I ядра атома азота равно 1; при взаимодействии электрона с ядром, имеющим спиновое квантовое число I , в спектре ЭПР появляется $2I + 1$ линий.) Форма и ширина линий определяются анизотропией сверхтонкого взаимодействия электрона с ядром азота и анизотропией g -фактора нитроксидной группы (гл. 9). В свою очередь степень анизотропии этих параметров зависит от движения молекулы-зонда.

ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ЭПР ПЕРЕМЕЩЕНИЙ ФОСФОЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ МЕЖДУ ПОВЕРХНОСТЯМИ БИСЛОЯ

Весьма интересным является вопрос о том, могут ли фосфолипидные молекулы перемещаться с одной поверхности бислоя на другую и если да, то каковы характерные времена этого процесса. Исследование перескока фосфолипидов в мембранах пузырьков было выполнено следующим образом. Прежде всего в молекулы фосфатидилхолина была вве-

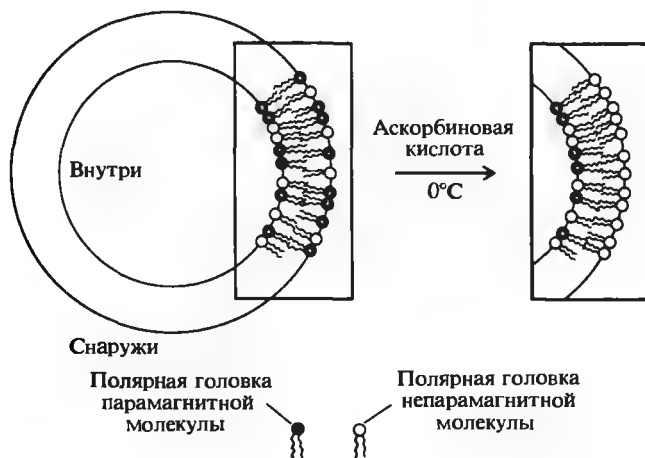


РИС. 25.16. Схема опыта, основанного на обработке аскорбиновой кислотой бислойных пузырьков, состоящих частично из парамагнитных молекул фосфатидилхолина.

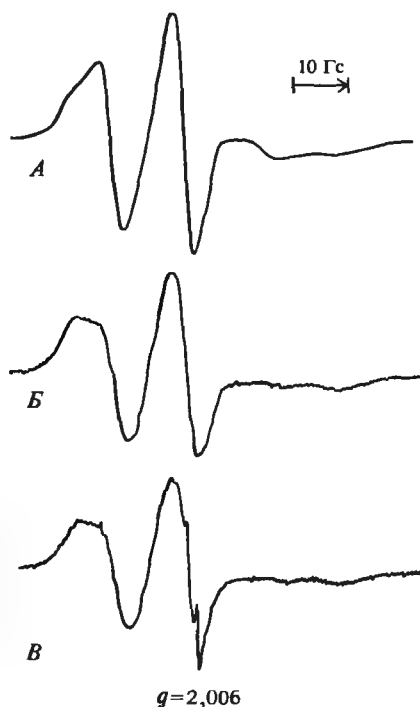


РИС. 25.17. Спектры ЭПР спин-меченных пузырьков. А. Спектр до обработки аскорбиновой кислотой; относительное увеличение = 1,0. Б. Спектр после кратковременной обработки аскорбиновой кислотой; относительное увеличение = 6. В. Спектр после дальнейшей обработки аскорбиновой кислотой; относительное увеличение = 6. (Kornberg R. D., McConnell H. M., Biochemistry, 10, 1111, 1971.)

дена нитроксидная метка. Затем меченые молекулы смешали с обычными молекулами фосфатидилхолина и использовали эту смесь для образования бислойных пузырьков. На рис. 25.16, который иллюстрирует этот эксперимент, полярные головки парамагнитных и непарамагнитных молекул изображены темными и светлыми кружками соответственно. После обработки бислоя аскорбиновой кислотой при 0°C парамагнитные меченые молекулы на наружной стороне бислоя переходят в непарамагнитное состояние. Молекулы, которые находятся на внутренней поверхности мембраны, недоступны для аскорбиновой кислоты, и их спектр ЭПР в ее присутствии не изменяется. Таким образом, после устранения всех парамагнитных меток на наружной стороне мембраны скорость уменьшения парамагнетизма бислоя становится мерой скорости, с которой фосфолипидные молекулы перескакивают с внутренней стороны мембраны на наружную.

На рис. 25.17 приведены данные такого рода эксперимента. Спектр ЭПР бислоя, не обработанного аскорбиновой кислотой (рис. 25.17, А), имеет значительно большую интенсивность, чем спектр бислоя после кратковременной обработки при 0°C (рис. 25.17, Б). Дальнейшая обработка пузырьков аскорбиновой кислотой не приводит к изменению интенсивности сигнала (рис. 25.17, В). Этот факт означает, что молекулы аскорбиновой кислоты не проникают внутрь пузырька и что скорость перескоков при 0°C чрезвычайно мала.

Была измерена скорость перехода фосфолипидов с внутренней поверхности мембраны на наружную после повышения температуры системы до 30°C . Для определения числа перескоков за единицу времени периодически охлаждали систему до 0°C , обрабатывали ее аскорбиновой кислотой и снимали спектр ЭПР, с тем чтобы оценить число перескоков, происходящих за данный отрезок времени при 30°C . Так как число имеющихся парамагнитных центров прямо пропорционально интегральной интенсивности спектра ЭПР, не-

сложно определить число молекул на внутренней поверхности бислоя. Используя этот подход, Корнберг и Мак-Коннелл (R. Kornberg, H. McConnell) оценили скорость перехода молекулы фосфолипида с внутренней поверхности на наружную при 30° С и получили величину $0,07 \text{ ч}^{-1}$. Однако это число может быть лишь оценкой сверху для данной величины (Rothman, Dawidowicz, 1975). Как бы то ни было, ясно, что перескок липидов — это относительно медленный процесс, и любая асимметрия в распределении фосфолипидов в мембране может сохраняться достаточно долго.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕКТРА ЭПР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ДИФФУЗИИ В МЕМБРАНАХ

Еще один динамический параметр, который можно определить методом ЭПР, — это скорость латеральной диффузии фосфолипидов в мембранах пузырьков (везикул). При этом можно использовать подход, основанный на анализе спектров ЯМР фосфатидилхолиновых пузырьков при наличии небольшого количества спин-меченного фосфатидилхолина (ФХ). Суть подхода заключается в том, что быстрая диффузия меченого ФХ должна существенно изменять ширину линий спектра протонного магнитного резонанса. В частности, линии уширяются в результате взаимодействий ядер с неспаренными электронами спин-меченных зондов (гл. 9).

Эксперименты проводились с использованием спин-меченного ФХ, структурная формула которого приведена на рис. 25.18. Даже в присутствии малых количеств этого соедине-

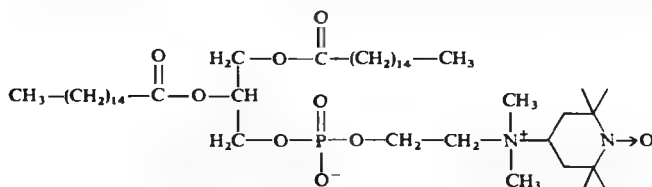


РИС. 25.18. Спин-меченный фосфатидилхолин (ФХ).

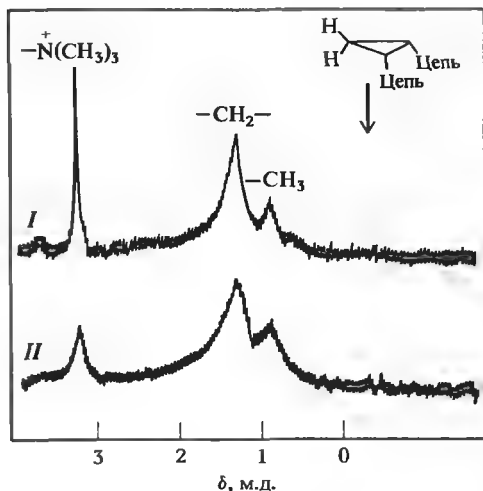


РИС. 25.19. Влияние спин-меченного ФХ на спектр ядерного магнитного резонанса фосфатидилхолиновых пузырьков. Спектры сняты при рабочей частоте 100 МГц и температуре 35°С. Кривая I — спектр пузырьков из чистого дипальмитат-ФХ; относительное увеличение = 1,0. Кривая II — спектр пузырьков, содержащих около 1 мол.% спин-меченного дипальмитат-ФХ; относительное увеличение = 1,4. (Kornberg R. D., McConnell H. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 2564, 1971.)

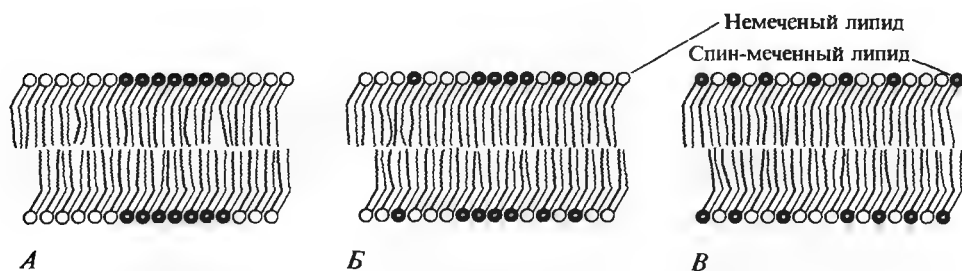


РИС. 25.20. Схема опыта по определению скорости латеральной диффузии. (Devaux P., McConnell H. M., J. Am. Chem. Soc., **94**, 4475, 1972.)

ния ширина линий спектра протонного магнитного резонанса фосфатидилхолиновых пузырьков существенно меняется (рис. 25.19). На рисунке *I* — это спектр протонного магнитного резонанса пузырьков при рабочей частоте 100 МГц и температуре 35°C. Четко видны пики, отвечающие протонам головок, метиленовых групп и концевых метильных групп. Добавление спин-меченного ФХ в концентрации всего 1 мол. % порождает спектр *II*. Видно, что происходит уширение всех пиков. Результаты детального анализа ширины пиков и других данных четко показывают, что имеет место быстрая латеральная диффузия спин-меченного ФХ. По оценкам частота диффузионного трансляционного перехода молекул (соответствующая скорости парной перестановки соседних молекул) значительно превышает $3 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ при 0°C.

Более точную оценку скорости латеральной диффузии можно получить с помощью другого подхода, основанного на применении спин-меченных молекул ФХ. Для этого спин-меченные липидные молекулы вводят в какое-то одно место бислоя (рис. 25.20, *A*). Эти молекулы, диффундируя в его плоскости, через некоторое время распределяются равномерно по всему бислою (рис. 25.20, *Б*, *В*). Когда меченые молекулы сконцентрированы в одном месте бислоя, между ними возникают сильные обменные спиновые взаимодействия. Они порождают довольно размытый широкий спектр ЭПР. По мере того как молекулы в процессе диффузии расходятся, обменные спиновые взаимодействия уменьшаются и возникает совершенно иной спектр. Наконец, устанавливается равномерное распределение, и мы опять получаем знакомый спектр нитроксидного радикала с тремя максимумами.

На рис. 25.21 приведены данные, полученные этим методом. Два набора спектров были сняты через разное время после начала латеральной диффузии спин-меченного ФХ (который первоначально был сконцентрирован в одном месте) в бислоях, состоящих из дигидростеркулоилфосфатидилхолина. Спектры, расположенные слева, были получены, когда силовые линии приложенного поля были перпендикулярны (90°) плоскости бислоя; спектры, расположенные справа, были получены в случае, когда приложенное поле было параллельно (0°) плоскости бислоя. В каждый данный момент времени спектры для двух направлений поля различаются. Этот результат показывает, что спин-меченные молекулы имеют предпочтительную анизотропную ориентацию. В начале эксперимента ($t = 0$) меченые молекулы ФХ сконцентрированы в одном месте, и наблюдается широкий спектр. В ходе диффузии начинают проявляться три линии, и через 40—50 часов становятся четко различимы все особенности спектров невзаимодействующих молекул.

Эти данные можно использовать для получения грубой оценки коэффициента диффузии *D*. Среднеквадратичное расстояние, на которое перемещается диффундирующая частица за время *t*, равно $(4Dt)^{1/2}$. Предположим, что первоначально пятно, в котором были сконцентрированы спин-меченные молекулы, имело радиус r_0 . Спектр, характерный для не-

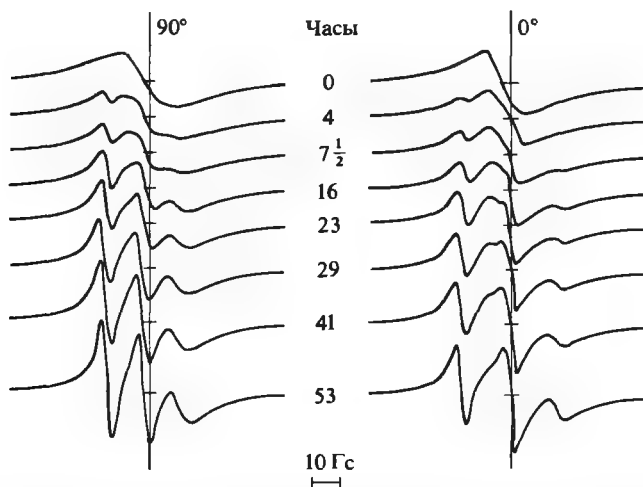


РИС. 25.21. Спектры электронного парамагнитного резонанса спин-меченных пузырьков, снятые через разное время после начала латеральной диффузии. (Devaux P., McConnell H. M., J. Am. Chem. Soc., **94**, 4475, 1972.)

взаимодействующих молекул ФХ, появится тогда, когда спин-меченная молекула переместится на расстояние порядка $2r_0$. Для $r_0 \cong 0,8$ мкм из спектров, приведенных на рис. 25.21, получаем для D величину порядка $10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Более точный анализ дает $1,8 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ при 25°C (Devaux, McConnell, 1972). Это соответствует частоте парных перестановок соседних молекул около 10^7 с^{-1} .

ПЕРЕХОД ПОРЯДОК — БЕСПОРЯДОК В ФОСФОЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ

Как мы упоминали, в искусственных мембранах при изменении температуры наблюдается переход липидных молекул из упорядоченного состояния в неупорядоченное. Аналогичный переход наблюдается и в биологических мембранах. Этот процесс изучали многими методами, в том числе методом ЭПР. Так, Захман и Тройбл (E. Sackmann, H. Träuble) анализировали спектр ЭПР спин-меченного стероида, введенного в липидную фазу искусственной однослойной мембраны. На рис. 25.22 изображена структура этого спин-меченного стероида, а на рис. 25.23 — липидный однослойный пузырек, содержащий во внутренней полости органический растворитель.

На рис. 25.24 приведены спектры ЭПР для разных температур, полученные при молярном отношении метки к липидам, равном 0,01. «Фазовый переход» в этой системе происходит между 30 и 40°C . Из рисунка ясно видно, что в этом диапазоне температуры в спектрах происходят существенные изменения. При повышении температуры особенно заметно уменьшение ширины линий. Зависимость этого параметра от температуры представлена на рис. 25.25, и по ней можно следить за ходом процесса.

Форма линий в спектрах на рис. 25.24 в значительной степени определяется спиновыми обменными взаимодействиями между мечеными стероидными молекулами. Это позволяет рассчитать частоту спиновых обменных процессов. Вычисления показывают, что эта частота уменьшается при переходе от низких температур к высоким, хотя обычно интенсивность спиновых обменных взаимодействий бывает пропорциональна T/η , где η — вязкость раствора. Поскольку, как правило, вязкость убывает с температурой, обыч-

РИС. 25.22. Структура спин-меченного стероида. Неспаренный электрон находится на атоме азота группы $N-O$.

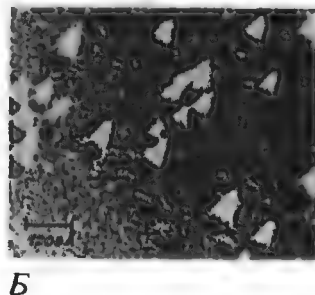
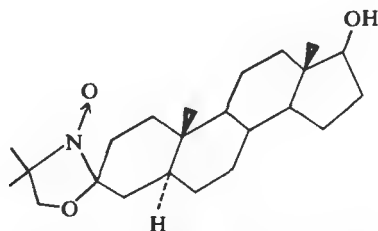


РИС. 25.23. Липидный монослойный пузырек. А. Схематическое изображение пузырька. Б. Электронная микрофотография нескольких монослойных пузырьков. Диаметр пузырьков в среднем равен примерно 500 Å. (Sackmann E., Träuble H, J. Am. Chem. Soc., **94**, 4482, 1972.)

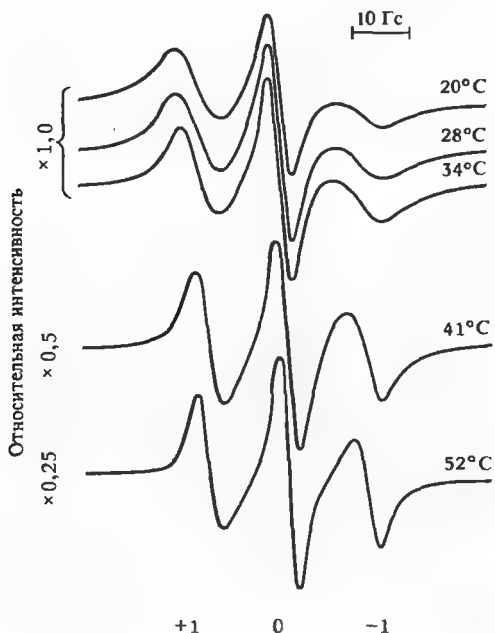


РИС. 25.24. Спектры ЭПР спин-меченных стероидов в монослойных пузырьках при разных температурах. Указаны магнитные квантовые числа (+1, 0, -1) для трех линий. (Sackmann E., Träuble H., J. Am. Chem. Soc., **94**, 4482, 1972.)

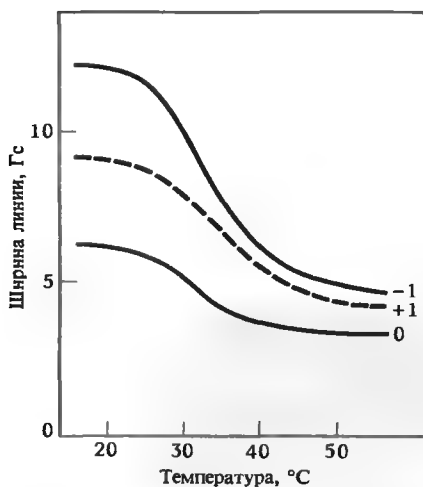


РИС. 25.25. Зависимость ширины трех линий, присутствующих в спектрах на рис. 25.24, от температуры. (Sackmann E., Träuble H, J. Am. Chem. Soc., 94, 4482, 1972.)

но частота спиновых обменных взаимодействий увеличивается с ростом температуры. Противоположный эффект, наблюдаемый в нашем случае, можно объяснить тем, что при повышении температуры в области фазового перехода происходит значительное изменение положения стероидной спиновой метки в искусственной мембране. Вероятно, ниже температуры перехода стероиды сгруппированы в кластеры, в которых могут иметь место сильные спиновые обменные взаимодействия. Выше температуры перехода эти молекулы распределены в плоскости монослоя более равномерно, так что спиновые обменные взаимодействия становятся гораздо менее интенсивными.

В природных мембранах переходы обычно происходят в широком температурном интервале. Это связано с большим разнообразием липидных компонентов, каждый из которых в чистом виде имеет какую-то одну характерную температуру перехода. В общем случае широкие переходы в природных мембранах приходятся на диапазон от 30 до 40° С, т.е. лежат в пределах физиологических температур. Использование клеток, ауксотрофных по жирным кислотам, дает возможность экспериментатору целенаправленно изменять липидный состав и тем самым сужать температурную область перехода.

ИЗГИБАНИЕ АЛИФАТИЧЕСКИХ ЦЕПЕЙ ВНУТРИ БИСЛОЯ

Имеется много данных, указывающих на то, что концевые метильные группы обладают значительно большей свободой, чем группы, расположенные около полярного конца молекулы. На основании этого можно ожидать, что метильные концы занимают больший эффективный объем, чем группы, находящиеся ближе к поверхности. Это может быть только в том случае, если группы на поверхности бислоя более плотно упакованы, чем те, которые расположены около метильных концов. Однако такая упаковка невозможна при параллельном расположении фосфолипидных молекул. Рис. 25.26 иллюстрирует один из путей решения этой проблемы. Здесь благодаря одинаковому изгибанию молекул межпочечное расстояние у поверхности бислоя получается меньше, чем около концевых метильных групп.

Гипотеза была проверена на бислоях из лецитина яйца. Для этой цели были синтезированы различные спин-меченные фосфолипиды (рис. 25.27). Различие состояло в том, что спиновая метка была присоединена к разным частям алифатических цепей фосфолипидов.

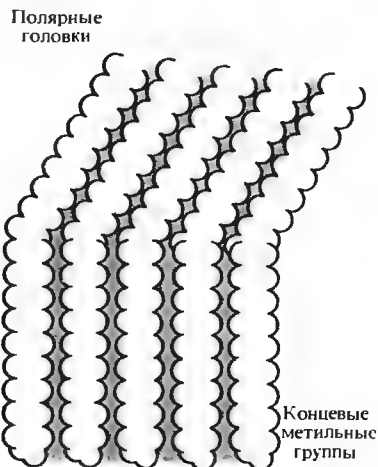


РИС. 25.26. Упаковка жирнокислотных цепей в половине плоского бислоя. (McFarland B. G., McConnell H. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1274, 1971.)

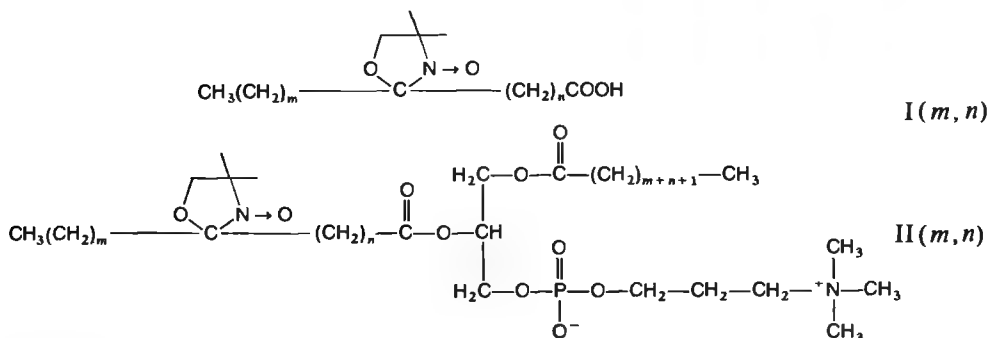


РИС. 25.27. Структурные формулы некоторых спин-меченных фосфолипидов. Индексы m и n могут меняться.

Положение метки определяется величинами m и n , обозначающими числа метиленовых групп, отделяющих метку от конечной метильной группы и от карбонильного атома углерода жирной кислоты соответственно. Изменяя положение спиновой метки вдоль алифатической цепи, можно исследовать влияние локализации метки на ее среднюю ориентацию.

В табл. 25.4 приведены значения угла ϕ_{HB} для различных m и n . Параметр ϕ_{HB} — это наиболее вероятный угол между плоскостью парамагнитного оксазолидинового кольца и плоскостью бислоя. Когда полиметиленовая цепь находится в вытянутой (полностью *транс*-) конформации, плоскость оксазолидинового кольца оказывается перпендикулярной углеводородной цепи. Следовательно, если цепь перпендикулярна поверхности бислоя, то плоскость кольца параллельна поверхности ($\phi_{\text{HB}} = 0^\circ$). Набор значений ϕ_{HB} получен при измерении среднего угла между главной осью молекулы-метки и перпендикуляром к поверхности мембраны. Когда метка расположена около поверхности мембраны (m, n) = (10,3), то $\phi_{\text{HB}} = 29\text{--}32^\circ$. Однако с уменьшением m и с увеличением n угол ϕ_{HB} уменьшается. Таким образом, при (m, n) = (1,14) мы имеем $\phi_{\text{HB}} = 5^\circ$. Из этих данных следует, что меченые молекулы в среднем как-то изогнуты около поверхности мембраны,

Таблица 25.4

ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРА $\phi_{\text{нв}}$ ДЛЯ ФОСФОЛИПИДНЫХ
СПИНОВЫХ МЕТОК, ВВЕДЕННЫХ В БИСЛОИ ИЗ МОЛЕКУЛ
ЯИЧНОГО ЛЕЦИТИНА¹⁾

m	n	$\phi_{\text{нв}}$
10	3	От 29 до 32°
7	6	От 28 до 31°
5	10	От 14 до 25°
1	14	5°

¹⁾McFarland B. G., McConnell H. M., Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 68, 1274, 1971.

при этом участки цепи вблизи концевых метильных групп направлены перпендикулярно поверхности мембраны. Более того, эти данные показывают, что время жизни молекулы с данным направлением наклона участка цепи вблизи головки должно быть больше чем 10^{-8} с; если бы переходы между структурами с разным направлением наклона происходили с частотой, большей чем 10^8 с^{-1} , то измеряемое среднее значение $\phi_{\text{нв}}$ было бы близко к 0° . Наклон участка цепи около 30° вблизи головок, по-видимому, приводит к увеличению плотности углеродных атомов у поверхности примерно на 12% по сравнению с плотностью концевых метильных групп.

Возникает вопрос: не является ли наблюдаемый наклон фосфолипидных молекул результатом возмущения, вызванного введением парамагнитного оксазолидинового кольца? Чтобы на него ответить, А. Силиг и Ж. Силиг (A. Seelig, J. Seelig, 1974) исследовали фосфолипидные аналоги, меченные дейтерием, при этом атомы дейтерия были расположены в строго определенных местах молекулы (этот подход аналогичен тому, который использовался в экспериментах со спиновыми метками). Измерения ядерного квадрупольного расщепления приводят к результатам, качественно подобным тем, что были получены в экспериментах со спиновыми метками. Количественные различия между двумя подходами могут быть связаны с разными временными масштабами этих двух типов измерений (McConnell, 1976). Полученные результаты указывают на то, что изменение упорядоченности углеводов с продвижением внутрь бислоя — это свойство, присущее самому бислою, и оно не связано с введением спиновой метки.

ПРОНИКНОВЕНИЕ ВОДЫ ПОД ПОВЕРХНОСТЬ БИСЛОЯ

Хотя принято считать, что вода не входит в состав бислоя, некоторое ее количество все-таки может проникать внутрь его. Гриффит и др. (H. Griffith) исследовали проникновение воды, используя тот факт, что растворитель слабо влияет на спектры ЭПР нитроксидных меток. Они прослеживали влияние растворителей на изотропную константу сверхтонкого взаимодействия (СТВ) ^{14}N . Хотя влияние растворителя было весьма слабым, константы СТВ удалось измерить с точностью, достаточной для того, чтобы получить необходимую информацию. Измеряемые таким образом константы СТВ ^{14}N хорошо коррелируют с полярностью растворителя. Все эти данные используются затем для калибровки спектров, наблюдаемых в случае введения спиновых меток внутрь бислоев. Измеряя спектры спиновых меток, связанных с разными участками молекулы жирной кислоты, можно оценить полярность разных областей бислоя.

На рис. 25.28,А представлены результаты, полученные в исследованиях такого рода. В верхней части рисунка приведен график зависимости индекса полярности от расстояния

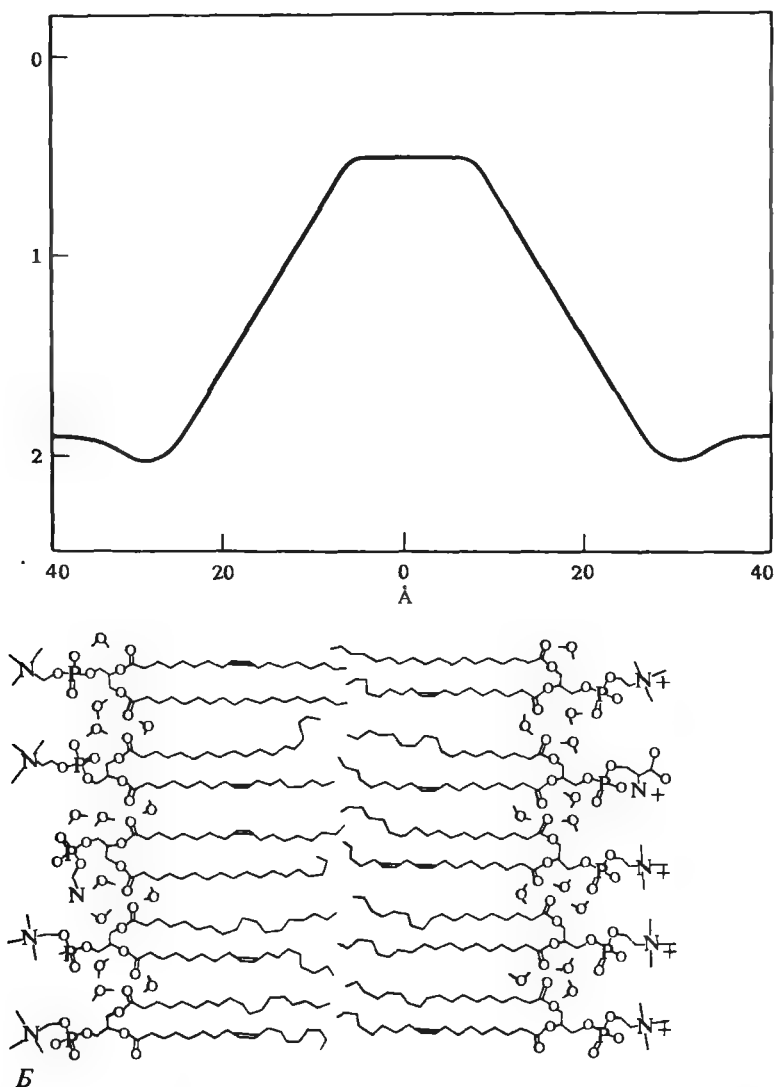


РИС. 25.28. Гидрофобный барьер в липидном бислое. А. Изменение полярности поперек бислоя. Б. Схематичное изображение бислоя. (Griffith O. H. et al., J. Membrane Biol., 15, 159, 1974.)

до середины липидного бислоя частиц из микросомной фракции. Эти данные показывают, что минимальная полярность, присущая чистому углеводороду, наблюдается в той части бислоя, которая расположена не далее 10 Å от его середины. Вне этой области полярность резко увеличивается, пока мы не попадем в область, где локализованы заряженные головки, расположенные на расстоянии 30 Å от середины. Точка 40 Å соответствует полярности воды; здесь полярность лишь немного меньше, чем в окрестности головок.

Эти данные показывают, что некоторое количество воды действительно проникает под поверхность бислоя. На рис. 25.28,Б схематически изображено поперечное сечение бислоя

и в соответствующем масштабе — несколько молекул воды. Отражен и тот факт, что ориентация концевых метильных групп в достаточной мере случайна.

Весь приведенный выше материал дает представление о некоторых применениях метода спиновых меток в биофизике мембран. Как легко видеть, с помощью этого подхода удалось получить некоторые из наиболее важных результатов, известных сегодня.

СПЕКТРЫ ПРОТОННОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА И СПЕКТРЫ ЯМР НА ЯДРАХ ^{13}C

Информацию о структуре бислоя можно получить также из спектров протонного магнитного резонанса (ПМР) и спектров ЯМР на ядрах ^{13}C . На рис. 25.29 приведен спектр ПМР дипальмитоил-L- α -лецитина, обработанного ультразвуком (обсуждение метода ЯМР см. в гл. 9). Такая обработка производится для того, чтобы предотвратить слипание молекул. По всей видимости, при этом уменьшается образование многослойных пузырьков и увеличивается доля бислойных пузырьков. Представлены спектры, снятые при трех разных температурах. В спектре, снятом при 50° С, четко видны линии резонансного поглощения, отвечающие метильным и метиленовым группам жирной кислоты (и линия, отвечающая метильной группе холина). При понижении температуры до 30° С линии, со-

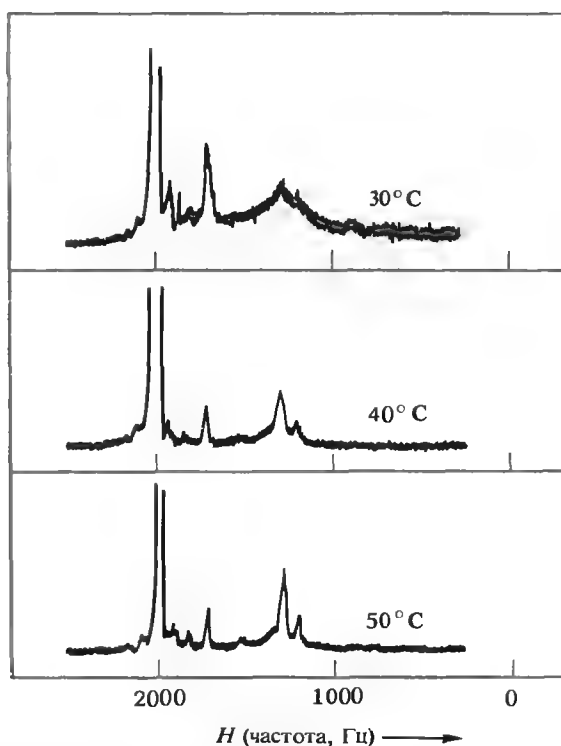


РИС. 25.29. Спектр протонного магнитного резонанса дипальмитоил-L- α -лецитина, обработанного ультразвуком, снятый при рабочей частоте 220 МГц при трех температурах. (Horwitz A. F. In: Membrane Molecular Biology, ed C. F. Fox and A. D. Keith, Stamford, Conn., Sinauer Associates, 1972, p. 164.)

ответствующие метильным и метиленовым группам, сильно уширяются, в то время как ширина линии протона метильной группы головки меняется слабо. Эти данные указывают на существенное изменение в структуре бислоя между 30 и 50° С, что связано с резким температурным переходом вблизи 41° С, при котором фосфолипиды из упорядоченного кристаллоподобного состояния переходят в более или менее неупорядоченное и мезоморфное.

Уширение линий протонов $-\text{CH}_3$ - и $-\text{CH}_2$ -групп жирной кислоты при 30° С может происходить в том случае, когда эти группы образуют упорядоченный ансамбль. Тогда уширение будет связано с уменьшением времени поперечной релаксации T_2 . Поскольку ширина линий протонов метильных групп головок меняется слабо, вероятно, переход порядок — беспорядок слабо влияет на окружение этих групп.

На рис. 25.30 приведены ^{13}C -спектры ЯМР дипальмитоиллецитина. Разрешение в этом случае значительно более высокое, чем у спектров ПМР. При 64° С четко видны пики, отвечающие атому углерода карбонильной группы жирной кислоты (C-1), атомам углерода C-2, C-3, C-14, C-15 и C-16 (концевая CH_3 -группа) и протонам метильных групп головок. Атомам углерода от C-4 до C-13 отвечает одна линия. За исключением пика от протона, принадлежащего метильной группе головки, все линии сильно уширяются с понижением температуры; при 25° С видна только линия от метильных групп холина. Этот эффект полностью аналогичен тому, который наблюдается для спектров, приведенных на рис. 25.29.

РАЗЛИЧИЯ В ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ В БИСЛОЕ

Для каждого из пиков в спектрах, представленных на рис. 25.30, были определены времена спин-решеточной релаксации T_1 при 52° С. Эти данные позволяют судить о перемещении различных участков фосфолипидных молекул. Время релаксации чувствительно к колебаниям молекулы как целого и к внутримолекулярным перемещениям. Если τ_m — время колебательной (или вращательной) корреляции, а $\tau_{\text{вм}}$ — время корреляции внутримолекулярного движения, то $T_1 \propto \tau_m^{-1} + \tau_{\text{вм}}^{-1}$. Чем быстрее происходят колебания молекулы как целого и внутримолекулярное движение, тем больше становится величина T_1 ¹⁾.

На рис. 25.31 приведены времена спин-решеточной релаксации различных углеродных атомов дипальмитоиллецитина при 52° С. Эти времена указаны для всех атомов углерода, причем каждое число — это среднее для двух жирнокислотных цепей. По мере перемещения от концевой метильной группы к середине алифатической цепи T_1 уменьшается. С приближением к полярной головке время T_1 для соответствующих метиленовых групп достигает своего наименьшего значения; затем для углеродных атомов холина оно опять увеличивается.

Конечно, следует помнить, что эти значения T_1 (полученные при 52° С) соответствуют температуре значительно более высокой, чем температура фазового перехода в бислое (~40° С). Измерить T_1 для отдельных углеродных атомов алифатической цепи ниже тем-

¹⁾ Напомним, что $1/T_1$ — это константа скорости первого порядка, характеризующая процесс увеличения продольной намагниченности образца по мере достижения ею равновесного значения после включения магнитного поля. T_1 определяется флуктуирующими магнитными взаимодействиями окружающего раствора (решетки) с прецессирующими ядрами (см. гл. 9). Быстрое молекулярное движение выравнивает локальные решеточные поля, так что их суммарное действие ослабляется; этот эффект увеличивает время, необходимое для установления равновесной намагниченности образца.

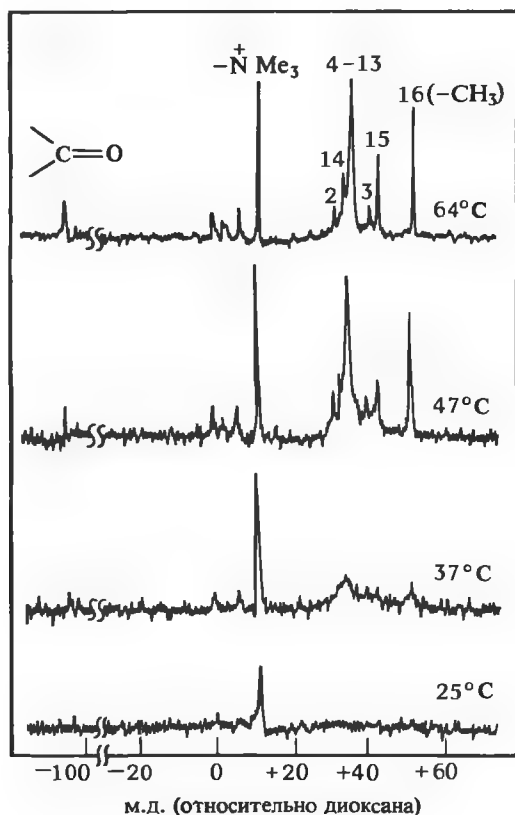


РИС. 25.30. ^{13}C -спектры ЯМР дипальмитоиллецитина в D_2O при четырех температурах. (Levine Y. K. et al., *Biochemistry*, **11**, 1416, 1972.)

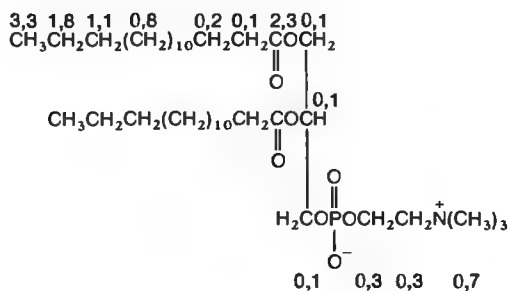


РИС. 25.31. Времена спин-решеточной релаксации атомов ^{13}C (T_1) (в секундах) для углеродных центров дипальмитоиллецитина в D_2O при 52°C . (Levine Y. K. et al., *Biochemistry*, **11**, 1416, 1972.)

пературы фазового перехода не удастся из-за очень большого уширения линий (рис. 25.30).

Изменение значения T_1 метиленовых групп углеродных атомов указывают на то, что фосфолипидная молекула обладает внутренними степенями свободы. Если бы T_1 определялось только вращением молекулы как целого, углеродные атомы всех метиленовых групп имели бы одинаковые времена спин-решеточной релаксации.

Время T_1 резко возрастает по мере приближения к концевой метильной группе. Это означает, что подвижность цепи вблизи метильного конца более высокая. Относительно большие значения T_1 метильных групп холина указывают на то, что цепь тоже достаточно подвижна в этой области. Времена спин-решеточной релаксации углеродных атомов метиленовых групп глицериновой части молекулы одни из самых малых во всей фосфолипидной молекуле. Этот факт, по-видимому, означает, что у поверхности бислоя наибольшей упорядоченностью и самой малой подвижностью обладают группы, принадлежащие глицериновой части молекулы.

Все эти данные служат прекрасной иллюстрацией того, какую ценную информацию о структуре можно получить, измеряя величину T_1 для отдельных ядер. Хотя бислой в значительной мере «расплавлен», систематическое изменение T_1 четко указывает, что и при повышенной температуре ему присуща определенная структурная организация. Таким образом, надо твердо помнить, что «расплавленный» бислой не находится в аморфном состоянии.

При повышении температуры до 65°C значения T_1 для всех углеродных атомов увеличиваются. Это и понятно, поскольку увеличивается подвижность всех участков фосфолипидной молекулы. Однако относительные значения T_1 различных углеродных атомов располагаются в том же порядке, что и раньше. Это значит, что бислой сохраняет некоторую упорядоченность даже при 65°C .

МИКРОСРЕДА ВНУТРИ БИСЛОЯ

Для лецитиновых бислоев определялось также время поперечной релаксации (T_2). Эти измерения позволили получить представление о микроокружении отдельных участков цепи ниже температуры фазового перехода, когда система находилась в упорядоченном состоянии. На рис. 25.32 приведена кривая уменьшения сигнала ПМР (в полулогарифмическом масштабе) для лецитинового бислоя при 30°C , полученная Чаном и др. (S. Chan).

Для единичного процесса релаксации должна была бы получиться прямая с наклоном, равным T_2 , однако график существенно нелинеен. Следовательно, должно иметь место некоторое распределение времени поперечной релаксации. Наличие такого распределения обусловлено тем, что отдельные ядра имеют разное окружение. В пользу этой гипотезы говорит анализ формы пика в спектре, снятом при 220 МГц, и спектр, снятый при 100 МГц с фурье-преобразованием. Эти результаты подтверждают предположение о том, что даже в упорядоченном бислое микроокружение разных участков молекулы жирной кислоты существенно различается. Фейгенсон и Чан (G. Feigensohn, S. Chan, 1974) исследовали лецитиновые мультислои, которые дают некоторые преимущества при измерении времени спин-решеточной релаксации.

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО СТРУКТУРЫ БИСЛОЕВ

Данные, представленные в этом разделе, позволяют получить достаточно полное представление об особенностях строения бислоев. Они показывают, что тенденцию амфифильных молекул к образованию бислоев можно объяснить, исходя из простых термоди-

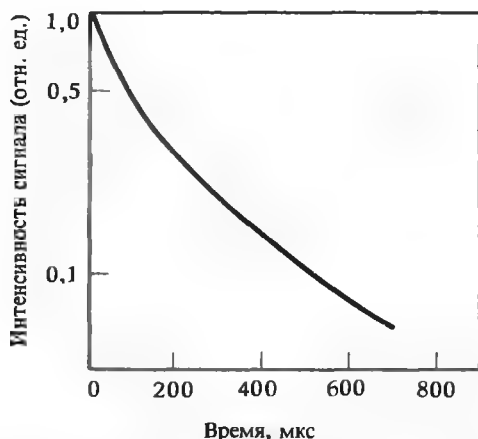


РИС. 25.32. Изменение сигнала ПМР лецитинового бислоя при 30°C; поле 14,1 килोगаусс. (Chan S. I. et al., *Nature*, **231**, 110, 1971.)

наимических принципов и некоторых геометрических соображений. С помощью рентгеноструктурного анализа было установлено, что, помимо других особенностей, бислои обладают тем свойством, что алифатические цепи перпендикулярны поверхности бислоя. Применение методов ЭПР и ЯМР позволило выявить такие свойства бислоя, как изгибание цепей около его поверхности, перескок фосфолипидов с одной стороны бислоя на другую, латеральная диффузия фосфолипидов и подвижность разных участков алифатических цепей.

Изучение свойств бислоев служит основой для понимания строения биологических мембран. У биологической мембраны в бислои обычно погружены белковые молекулы. Это могут быть ферменты или рецепторы, специфичные для определенных молекул; некоторые из них могут играть роль в активном транспорте или в регуляции проницаемости мембраны для отдельных веществ. Функционирование этих белков зависит от структурных и динамических свойств бислоев, описанных в настоящей главе. Более подробно структура и функции биологических мембран рассмотрены в гл. 4.

Краткие выводы

Равновесное распределение по разные стороны мембраны диффундирующих молекул, которые способны проникать через эту мембрану, определяется термодинамическими законами, согласно которым химические потенциалы диффундирующего вещества должны быть одинаковы с обеих сторон мембраны. Это требование приводит к ряду интересных следствий и имеет большую практическую ценность. Оно объясняет явление осмоса в системах, в которых по одну сторону полупроницаемой мембраны находятся макромолекулы, и зависимость осмотического давления от молекулярной массы макромолекул. На нем основан эффект Доннана, заключающийся в том, что наличие заряженных макромолекул по одну сторону мембраны приводит к неодинаковому распределению малых ионов, свободно диффундирующих через мембрану. Эффект Доннана в свою очередь ответствен за появление мембранного потенциала. В биологических мембранах благодаря использованию такого источника энергии, как реакция гидролиза АТФ, работают ионные насосы (например, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насос). Это приводит к созданию градиента ионных кон-

центраций через мембрану, которые нельзя объяснить, исходя из простых термодинамических соображений, не учитывающих источники энергии, приводящие в действие «насос».

Структурной основой биологических мембран является бислой, состоящий из липидных амфифильных молекул, полярные головки которых контактируют с водной средой, а углеводородные цепи собраны вместе внутри бислоя. Бислой образуется в соответствии с теми же принципами, которые определяют образование мицелл. Можно показать, что отношение площади поверхности мицеллы к числу головок влияет на форму и размер мицеллы. В то время как одноцепочечные амфифильные молекулы образуют глобулярные мицеллы, для двухцепочечных амфифильных молекул (когда к одной полярной головке присоединены две неполярные цепи) отношение площади поверхности к числу головок таково, что более предпочтительной является бислойная структура.

Структура и функция бислоя исследовались многими физическими методами, в том числе с помощью рентгеноструктурного анализа, методами ЯМР и ЭПР. Рентгеноструктурные исследования выявили, что углеводородные цепи расположены перпендикулярно поверхности бислоя, причем расстояние между цепями составляет 4—5 Å. Было показано также, что в бислое имеет место латеральная диффузия молекул с константой диффузии порядка $10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Имеющиеся данные указывают на то, что гибкость амфифильной молекулы и подвижность отдельных ее участков изменяются по мере перехода от головок к центру бислоя; оказалось, что подвижность цепи больше в толще бислоя, а вблизи головок положение ее более фиксировано. Таким образом, бислой по своей природе — структура не статическая, а динамическая. Более того, бислой может переходить из упорядоченного состояния в неупорядоченное мезоморфное. Эти и другие результаты дают ключ к пониманию поведения биологических мембран.

Задачи

25.1. Предположим, что макромолекула M_1 димеризуется по схеме $2M_1 \rightleftharpoons M_2$ с константой равновесия K , определяемой как $K = (M_1)^2/(M_2)$, где (M_1) и (M_2) — молярная концентрация соответствующих соединений. Пусть полное осмотическое давление π в системе задается уравнением (25.14), $\hat{c}_1$ и $\hat{c}_2$ — концентрации M_1 и M_2 в граммах на литр, а $\hat{c}$ — полная концентрация макромолекул, присутствующих в виде мономера, т.е. $\hat{c} = \hat{c}_1 + 2\hat{c}_2$. Покажите, что при малых $\hat{c}$ можно представить π в виде ряда по степеням $\hat{c}$

$$\pi = RT(M^{-1}\hat{c} + B\hat{c}^2)$$

где M — молекулярная масса мономера. Найдите выражение для B .

25.2. Пусть с одной стороны полупроницаемой мембраны (стороны 2) присутствуют заряженные макромолекулы. Их концентрация равна 10 мкМ, а средний заряд на каждой +9,9. Макромолекулы находятся в разбавленном водном растворе NaCl. Оказалось, что со стороны 1 мембраны $(\text{Na}^+) = 10 \text{ мкМ}$, а со стороны 2 $(\text{Cl}^-) = 50 \text{ мкМ}$. Соответствуют ли эти значения ионных концентраций тем, которые должны наблюдаться в системе, находящейся в термодинамическом равновесии относительно распределения ионов Na^+ и Cl^- по разные стороны мембраны? Почему?

25.3. Делается следующее утверждение: «Когда длинный широкий плоский бислой замыкают в сферический бислойный пузырек, то площадь наружной поверхности этого пузырька остается практически равной площади одной из плоскостей бислоя, если радиус пузырька существенно превышает толщину бислоя». Верно ли это? Проверьте утверждение, проведя соответствующие вычисления в предположении, что длина амфифильных

молекул в обоих случаях равна l , объем самого бислоя не меняется и что поправкой, вносимой краями плоского бислоя в общую площадь поверхности, можно пренебречь.

25.4. Исследуется образование мицелл из одноцепочечных амфифильных молекул при разных концентрациях соли. Предположим, что имеется метод определения формы мицелл, с помощью которого обнаруживается, что форма мицелл резко меняется в интервале концентраций NaCl в растворе от 0,01 до 0,5 М. Объясните это изменение формы. Будет ли меняться также и размер мицелл при увеличении концентрации соли? Поясните ваш ответ. Как, по-вашему мнению, изменится форма мицелл (и их размеры, если они происходят)?

25.5. Изолированный мембранный белок случайным образом метят по поверхности молекулы нитроксидной спиновой меткой и вводят его в бислойный пузырек. Известно, что белковая молекула имеет форму цилиндра и что ось этого цилиндра параллельна поверхности бислоя. В пузырек вводят аскорбиновую кислоту, после чего наблюдается уменьшение интенсивности сигнала ЭПР из-за восстановления радикалов аскорбиновой кислотой. Вслед за начальным ослаблением сигнала, связанным с восстановлением парамагнитных центров, выступающих во внутреннюю полость пузырька, наблюдается двухфазный процесс, описываемый двумя экспоненциальными функциями: относительно «быстрой» и «медленной». Объясните эти результаты, учитывая положение белковой молекулы в бислое и ее перемещение.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Tanford C.*, 1961. *Physical Chemistry of Macromolecules*, New York, Wiley. [Имеется перевод: Танфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1965. Гл. 4 посвящена термодинамике; в ней обсуждаются вопросы равновесия по разные стороны мембран, осмотическое давление, эффект Доннана и др.]
- Tanford C.*, 1973. *The Hydrophobic Effect*, New York, Wiley. [Хорошо изложены вопросы термодинамики мицелл и бислоев.]
- Weissmann G., Claiborne R., eds.*, 1975. *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology*, New York, HP Pub. Co. [Хорошо написанные обзорные статьи по общим проблемам структуры и функций мембран.]

Специальная

- Chan S. I., Lindsey H., Eigenberg K. E., Croasman W. R., Campbell G. W.*, 1979. In: *NMR and Biochemistry*, ed. S. J. Opella and P. Lu, New York, Marcel Dekker, p. 249.
- Donnan F. G.*, 1911. Theorie der membrangleichgewichte und membranpotentiale bei vorhandensein von nicht dialysierenden electrolyten: Ein beitrag zur physikalisch-chemischen physiologie, *Z. electrochem.*, **17**, 572.
- Feigenson G. W., Chan S. I.*, 1974. Nuclear magnetic relaxation behavior of lecithin multilayers, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 1312.
- Fox C. F.*, 1975. Phase transitions in model systems and membranes. In: *Biochemistry of Cell Walls and Membranes*, ed. C. F. Fox, London, Butterworths, MTP International Review of Science, Biochemistry Series One, p. 279.
- Keith A. D., Sharnoff M., Cohn G. E.*, 1973. A summary and evaluation of spin labels used as probes for biological membrane structure, *Biochem. Biophys. Acta*, **300**, 379.

- Levine Y. K., Wilkins M. H. F.*, 1971. Structure of oriented lipid bilayers, *Nature, New Biology*, **230**, 69.
- McConnell H. M.*, 1976. Molecular motion in biological membranes. In: *Spin Labeling*, ed. L. Berliner, New York, Academic Press, p. 525.
- Nicolson G. L., Poste G., Ji T. H.*, 1977. The dynamics of cell membrane organization. In: *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization*, ed. G. Poste and G. L. Nicolson, Amsterdam, North Holland, p. 1.
- Rothman J. E., Dawidowicz E. A.*, 1975. Asymmetric exchange of vesicle phospholipids catalyzed by the phosphatidylcholine exchange protein: Measurement of inside-outside transitions, *Biochemistry*, **14**, 2809.
- Seelig A., Seelig J.*, 1974. The dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance, *Biochemistry*, **13**, 4839.
- Shipley G. G.*, 1973. Recent x-ray diffraction studies of biological membranes and membrane components. In: *Biological Membranes*, vol. 2, ed. D. Chapman and D. F. H. Wallach, London, Academic Press, p. 1.

Приложение А

Основы матричной алгебры

Матрицей называется таблица, элементами которой являются числа или символы. Например,

$$\begin{pmatrix} 8 & 7 \\ 23 & 28 \end{pmatrix}, \quad \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

— это матрицы размером 2×2 (содержащие по две строки и по два столбца); символ a_{12} обозначает элемент, принадлежащий первой строке и второму столбцу. В общем случае a_{ij} представляет собой элемент i -й строки и j -го столбца. Для левой матрицы $a_{22} = 28$, $a_{21} = 23$ и т.д. В этой книге матрицы обозначаются буквами, выделенными жирным шрифтом со значком «тильда» под ними. Например, мы можем представить правую из приведенных выше матриц как $\underline{\underline{A}}$, где

$$\underline{\underline{A}} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

Матрица-строка (называемая также вектор-строкой) состоит только из одной строки:

$$\underline{\underline{A}}_r = (a_{11}, a_{12})$$

$\underline{\underline{A}}_r$ — это матрица размером 1×2 (с одной строкой и двумя столбцами). *Матрица-столбец* (или вектор-столбец) состоит только из одного столбца:

$$\underline{\underline{A}}_c = \begin{pmatrix} a_{11} \\ a_{21} \end{pmatrix}$$

$\underline{\underline{A}}_c$ — это матрица размером 2×1 (с двумя строками и одним столбцом). В общем случае матрица может быть любого размера — с n строками и m столбцами.

Перемножение матриц

Две матрицы могут быть перемножены, так что получится третья матрица:

$$\underline{\underline{a}}\underline{\underline{b}} = \underline{\underline{c}}$$

Элемент c_{ij} матрицы $\underline{\underline{c}}$ определяется как

$$c_{ij} = \sum_k a_{ik}b_{kj}$$

Таким образом, чтобы получить элементы c_{ij} , нужно элементы i -й строки матрицы $\underline{\underline{a}}$ попарно перемножить с элементами j -го столбца матрицы $\underline{\underline{b}}$. Например, если

$$\underline{\underline{a}} = (a_{11}, a_{12})$$

и

$$\underline{\mathbf{b}} = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{pmatrix}$$

то

$$\begin{aligned} \underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}} &= (a_{11}, a_{12}) \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{pmatrix} \\ &= (a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21}, a_{11}b_{12} + a_{12}b_{22}) \end{aligned}$$

Таким образом,

$$\underline{\mathbf{c}} = (c_{11}, c_{12})$$

где

$$c_{11} = a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21}$$

$$c_{12} = a_{11}b_{12} + a_{12}b_{22}$$

Ясно, что перемножать матрицы можно только в том случае, когда число столбцов матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ равно числу строк матрицы $\underline{\mathbf{b}}$. В общем случае матрицу $n \times m$ можно умножить только на матрицу $m \times p$, где n и p произвольны; получающаяся матрица имеет размер $n \times p$. В только что рассмотренном примере для матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ $n = 1, m = 2$, а для матрицы $\underline{\mathbf{b}}$ $m = 2, p = 2$; умножение $\underline{\mathbf{a}}$ на $\underline{\mathbf{b}}$ дает матрицу $\underline{\mathbf{c}}$ размером $n \times p$, или 1×2 (матрица-строка).

Рассмотрим еще один пример. Пусть

$$\underline{\mathbf{a}} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

$$\underline{\mathbf{b}} = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{pmatrix}$$

$$\underline{\mathbf{c}} = \underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}}$$

$$= \begin{pmatrix} a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21} & a_{11}b_{12} + a_{12}b_{22} \\ a_{21}b_{11} + a_{22}b_{21} & a_{21}b_{12} + a_{22}b_{22} \end{pmatrix}$$

Таким образом, если матрицу 2×2 умножить на матрицу 2×2 , произведение также будет матрицей 2×2 .

Если матрицу 1×2 умножить на матрицу 2×1 , получится матрица 1×1 , которая является просто числом (скаляром) и не рассматривается далее как матрица. Например,

$$\underline{\mathbf{a}} = (a_{11}, a_{12})$$

$$\underline{\mathbf{b}} = \begin{pmatrix} b_{11} \\ b_{21} \end{pmatrix}$$

$$\underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}} = a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21}$$

Если матрица является квадратной (число строк равно числу столбцов), она может быть

возведена в любую степень. Например, для квадратной матрицы $\underline{\mathbf{M}}$

$$\underline{\mathbf{M}}^3 = \underline{\mathbf{M}}\underline{\mathbf{M}}\underline{\mathbf{M}}$$

$$\underline{\mathbf{M}}^N = \prod_{i=1}^N \underline{\mathbf{M}}$$

(последняя запись означает, что $\underline{\mathbf{M}}$ умножается на себя N раз). Эта операция возможна только с квадратной матрицей, потому что только в этом случае выполняется условие, необходимое для перемножения матриц. Отметим также, что если $\underline{\mathbf{M}}$ имеет размер $n \times n$, то и $\underline{\mathbf{M}}^N$ должна иметь размер $n \times n$.

Нахождение матрицы, обратной данной

Для квадратной матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ можно найти обратную матрицу $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$, такую, что

$$\underline{\mathbf{a}}^{-1}\underline{\mathbf{a}} = \underline{\mathbf{I}}$$

где $I_{ij} = 0$ для $i \neq j$; $I_{ij} = 1$ для $i = j$. Матрица $\underline{\mathbf{I}}$ называется *единичной*. Например, если $\underline{\mathbf{I}}$ — матрица 2×2 , то

$$\underline{\mathbf{I}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Отметим, что $\underline{\mathbf{I}}$ обладает тем свойством, что любая матрица, умноженная на нее, остается неизменной. Таким образом, $\underline{\mathbf{I}}$ аналогична числу 1 в скалярной алгебре, так что $\underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{I}} = \underline{\mathbf{a}}$. Найти $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$ сравнительно просто. Пусть, например,

$$\underline{\mathbf{a}} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

Тогда $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$ находится следующим образом:

$$\underline{\mathbf{a}}^{-1} = \begin{pmatrix} a_{22}/\alpha & -a_{12}/\alpha \\ -a_{21}/\alpha & a_{11}/\alpha \end{pmatrix}$$

где

$$\alpha = a_{11}a_{22} - a_{21}a_{12}$$

т.е. α является детерминантом матрицы $\underline{\mathbf{a}}$. (Ясно, что для существования $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$ детерминант не должен быть равен нулю.)

Приведение матрицы к диагональному виду

Для матрицы 2×2 существует матрица $\underline{\mathbf{T}}$, такая, что

$$\underline{\mathbf{T}}^{-1}\underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{T}} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix}$$

где λ_1 и λ_2 — собственные числа матрицы $\underline{\mathbf{a}}$, а $\underline{\mathbf{T}}$ называется преобразующей матрицей.

Вычислить собственные числа не составляет труда. Пусть

$$\underline{a} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

Чтобы найти λ_1 и λ_2 , нужно решить уравнение

$$\begin{aligned} 0 &= \begin{vmatrix} a_{11} - \lambda & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - \lambda \end{vmatrix} \\ &= (a_{11} - \lambda)(a_{22} - \lambda) - a_{12}a_{21} \\ &= \lambda^2 - (a_{11} + a_{22})\lambda + a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} \end{aligned}$$

Используя формулу для нахождения корней квадратного уравнения, получаем

$$\lambda = \{(a_{11} + a_{22}) \pm [(a_{11} + a_{22})^2 - 4(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21})]^{1/2}\}/2$$

Пусть λ_1 соответствует знаку «+», а λ_2 знаку «-», т.е. $\lambda_1 > \lambda_2$. Найдем матрицу $\underline{T}$. Если

$$\underline{a} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

то

$$\begin{aligned} \underline{T} &= \begin{pmatrix} (\lambda_1 - a_{22})/a_{21} & (\lambda_2 - a_{22})/a_{21} \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \\ \underline{T}^{-1} &= \begin{pmatrix} a_{21}/(\lambda_1 - \lambda_2) & (a_{22} - \lambda_2)/(\lambda_1 - \lambda_2) \\ -a_{21}/(\lambda_1 - \lambda_2) & (\lambda_1 - a_{22})/(\lambda_1 - \lambda_2) \end{pmatrix} \end{aligned}$$

где λ_1 и λ_2 — собственные числа матрицы $\underline{a}$.

Укажем два других полезных свойства матрицы $\underline{a}$ размером 2×2 .

$$\lambda_1 + \lambda_2 = a_{11} + a_{22}$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}$$

Этих соотношений вместе с только что приведенными выражениями для $\underline{T}$ и $\underline{T}^{-1}$ достаточно, чтобы получить выражения для преобразующей матрицы в уравнении (20.53) и обратной ей в уравнении (20.54). Нетрудно также обобщить эти результаты на случай матриц $n \times n$, где $n > 2$.

Полезное введение в матричную алгебру можно найти в гл. I книги Хильдебранда Ф. «Методы прикладной математики» (Hildebrand F. B. Methods of Applied Mathematics, Englewood Cliffs, N. Y., Prentice-Hall, 1965).

Приложение Б

Решение задач

ГЛАВА 15

15.1. Рассмотрим равновесие $M_{i-1} + L \rightleftharpoons M_i$. Имеется $\Omega_{n,i-1}$ микроформ, которые составляют M_{i-1} , и $\Omega_{n,i}$ микроформ, которые составляют M_i . Поэтому микроскопическая константа диссоциации равна

$$k = [(M_{i-1})/\Omega_{n,i-1}](L)/[(M_i)/\Omega_{n,i}]$$

тогда как макроскопическая константа диссоциации равна

$$K = (M_{i-1})(L)/(M_i)$$

Комбинирование этих двух выражений дает уравнение (15.20).

15.2. Если центры связывания лиганда являются идентичными и независимыми и характеризуются микроскопической константой диссоциации k , то $K_2 = (2/3)k$ и $K_3 = (3/2)k$ [уравнение (15.37)]. Поскольку получено, что $K_2 = K_3$, центры не являются независимыми и энергия взаимодействия $\Delta G_{1,23}$ при расчете по уравнению (15.39) равна

$$\begin{aligned}\Delta G_{1,23} &= -RT \ln K_2/K_3 + RT \ln[(\Omega_{4,1}/\Omega_{4,2})/(\Omega_{4,2}/\Omega_{4,3})] \\ &= RT \ln[(2/3)/(3/2)] = RT \ln(4/9)\end{aligned}$$

При 25°C (298,16 K) $\Delta G_{1,23} = -0,48$ ккал/моль.

15.3. Оппонент прав, так как значения K_i являются как раз проверкой предсказанных значений для случая идентичных независимых центров согласно уравнению (15.20). Если k — микроскопическая константа диссоциации, то из уравнения (15.20) мы имеем $K_1 = (1/6)k$, $K_2 = (2/5)k$, $K_3 = (3/4)k$, $K_4 = (4/3)k$, $K_5 = (5/2)k$ и $K_6 = 6k$. Отсюда видно, что $K_5 = 15 K_1$ и $K_4 = 8 K_1$.

15.4. Если половина L_1 -связывающих и половина L_2 -связывающих центров заняты, то

$$(L_2ML_1) + (ML_1) = (1/2)(M)_{\text{сум}}$$

$$(L_2ML_1) + (L_2M) = (1/2)(M)_{\text{сум}}$$

Разделив каждое из этих уравнений на $(M)_{\text{сум}}$, получаем

$$(ML_1)/(M)_{\text{сум}} = (L_2M)/(M)_{\text{сум}} = 1/2 - (L_2ML_1)/(M)_{\text{сум}} = 1/2 - \bar{y}_{12}$$

Из определения $(M)_{\text{сум}}$ и первых двух уравнений, приведенных выше, имеем

$$\begin{aligned}(M)_{\text{сум}} &= (M) + (ML_1) + (L_2M) + (L_2ML_1) \\ &= (M) + (1/2)(M)_{\text{сум}} + (1/2)(M)_{\text{сум}} - (L_2ML_1) \\ (M) &= (L_2ML_1)\end{aligned}$$

Из выражения для K_{12} [уравнение (15.89)]

$$\begin{aligned} K_{12} &= (L_2 M L_1) / (M) / (M L_1) (L_2 M) \\ &= (L_2 M L_1)^2 / (M L_1) (L_2 M) \end{aligned}$$

Используя наши выражения для $(M L_1) / (M)_{\text{сум}}$ и $(L_2 M) / (M)_{\text{сум}}$, находим

$$K_{12} = (L_2 M L_1)^2 / [(1/2) - \bar{y}_{12}]^2 (M)_{\text{сум}}^2 = \bar{y}_{12}^2 / (1/2 - \bar{y}_{12})^2$$

Это выражение представляет собой уравнение (15.91). Извлекая квадратный корень и решая его относительно $\bar{y}_{12}$, получаем уравнение (15.92). Из уравнений (15.89) и (15.91) имеем

$$\begin{aligned} \Delta G_{12}^0 &= -RT \ln K_{12} = -2RT \ln [\bar{y}_{12} / (1/2 - \bar{y}_{12})] \\ &= -2RT \ln [(2\bar{y}_{12} / (1 - 2\bar{y}_{12}))] \end{aligned}$$

Это выражение представляет собой уравнение (15.93).

15.5. Из определения $\tilde{K}_1$, $\tilde{K}_2$ и $\tilde{K}_3$ имеем

$$\begin{aligned} (L) / \tilde{K}_1 &= (M_1) / (M_0) \\ (L)^2 / \tilde{K}_2 &= (M_2) / (M_0) \\ (L)^3 / \tilde{K}_3 &= (M_3) / (M_0) \end{aligned}$$

Из определения микроскопических констант имеем

$$\begin{aligned} (M_1) / (M_0) &= (L) / k_1 + (L) / k_2 + (L) / k_3 \\ (M_2) / (M_0) &= (L)^2 / k_1 k_2 + (L)^2 / k_1 k_3 + (L)^2 / k_2 k_3 \\ (M_3) / (M_0) &= (L)^3 / k_1 k_2 k_3 \end{aligned}$$

Приравнивание двух выражений для величин $(M_i) / (M_0)$ дает

$$(L) / \tilde{K}_1 + (L)^2 / \tilde{K}_2 + (L)^3 / \tilde{K}_3 = [1 + (L) / k_1] [1 + (L) / k_2] [1 + (L) / k_3] - 1$$

или

$$1 + (L) / \tilde{K}_1 + (L)^2 / \tilde{K}_2 + (L)^3 / \tilde{K}_3 = [1 + (L) / k_1] [1 + (L) / k_2] [1 + (L) / k_3]$$

что идентично уравнению (15.54) для случая $n = 3$. Это выражение простое, поскольку произведение в правой части после перемножения дает все возможные комбинации $(L) / k_i$, которые в свою очередь после перемножения дают сумму $1 + (M_1) / (M_0) + (M_2) / (M_0) + (M_3) / (M_0)$. 335

ГЛАВА 16

16.1. Уравнение скорости для схемы (А) имеет следующий вид:

$$V = k_2(X_1) + k'_2(X_2)$$

Выразив (X_1) и (X_2) через $(E)_0$, (S) , K_1 и K_2 , получаем

$$V = k_2(E)_0 [1 + K_1(S) + K_1/K_2] + k'_2(E)_0 [1 + K_2(S) + K_2/K_1]$$

Мы хотим увидеть, можно ли это уравнение привести к форме уравнения (16.37), которое является уравнением скорости для схемы (Б). Найдем сначала выражение для V_{max} , предполагая, что $(S) \rightarrow \infty$

$$\begin{aligned} (V)_{S \rightarrow \infty} &= V_{\text{max}} = k_2(E)_0 [1 + K_1/K_2] + k'_2(E)_0 [1 + K_2/K_1] \\ &= (K_2 k_2(E)_0 + K_1 k'_2(E)_0) / [K_1 + K_2] \end{aligned}$$

Мы можем использовать это выражение для преобразования приведенного выше выражения для V к форме

$$V = V_{\max} [1 + K_1 K_2 / (K_1 + K_2) (S)]$$

Это уравнение идентично по форме уравнению (16.37), поэтому прав первый студент.

16.2. По аналогии с уравнением (16.37) имеем

$$v_i = V_s / [1 + K_s (SM)]$$

Нетрудно показать, что $(SM) = (S)_0 / [1 + K_{SM} (M)]$. Поэтому можно записать

$$v_i = V_s / [1 + K_s (1 + K_{SM} (M)) / (S)_0]$$

и

$$1/v_i = 1/V_s + (K_s/V_s) [1 + K_{SM} (M)] [1/(S)_0]$$

Ясно, что зависимости, приведенные в пп. а, б и в, описываются этим уравнением. Однако результаты п. г, которые означают, что реакция протекает и без M , не описываются этим уравнением. Поэтому необходимо ввести в схему дополнительную стадию:



16.3. Предположим, что в этом случае можно использовать простой механизм, представленный на схеме (16.48), и уравнение, из него вытекающее. Так как V_s не зависит от pH в диапазоне значений от 7,0 до 8,5, два значения pK групп фермент-субстратного комплексов, по-видимому, хорошо разделяются. Поэтому точки на кривых зависимости V_s от pH , в которых V_s уменьшается в два раза, дают pK_{ax} и pK_{bx} , равные 5 и 10,1 соответственно. Поскольку K_s не зависит от pH в широком интервале значений pH , из уравнения (16.58) следует, что $pK_{aE} = pK_{ax}$ и $pK_{bE} = pK_{bx}$.

16.4. Уравнение скорости для этой схемы имеет вид

$$-d\Delta(A \rightleftharpoons U)/dt = -k_2 \Delta((A, U)) + k_{-2} \Delta(A \rightleftharpoons U)$$

Выражение для $d\Delta((A, U))/dt$ для стационарных условий можно упростить:

$$\begin{aligned} -d\Delta((A, U))/dt &= (k_1((\bar{A}) + (U)) - k_{-2}) \Delta(A \rightleftharpoons U) \\ &+ (k_{-1} + k_2) \Delta((A, U)) = 0 \end{aligned}$$

Решение этого уравнения относительно $\Delta((A, U))$ и подстановка его в первое уравнение приводит к следующему выражению:

$$-d\Delta(A \rightleftharpoons U)/dt = \Delta(A \rightleftharpoons U)/\tau$$

где $1/\tau$ имеет такой вид, как в задаче. Мы ожидаем, что $\Delta((A, U))$ будет короткоживущей формой, поскольку она имеет только одну водородную связь. Коцентрационная зависимость $1/\tau$ идентична по форме зависимости в случае простого одностадийного механизма [см. уравнение (16.74)], и поэтому утверждение исследователя ошибочно.

16.5. Чтобы получить выражение для времени релаксации «очень медленной» стадии, предположим, что равновесие «быстрых» стадий всегда устанавливается быстро по сравнению со временем релаксации очень медленной стадии. Это означает, что равновесие на каждой «быстрой» стадии можно считать установившимся в ходе релаксации системы. Вывод можно продолжить в соответствии с выводом уравнений (16.85) — (16.90). Уравнение начальной скорости имеет вид

$$-d[(X_2) + (X_3)]/dt = -k_2(X_1) + k_{-2}(X_2)$$

При выводе полезно использовать следующие соотношения:

$$(X_2) + (X_3) \doteq (X_2)(1 + k_3/k_{-3})$$

$$\Delta[(X_2) + (X_3)] = \Delta(X_2)(1 + k_3/k_{-3})$$

$$\Delta(E) + \Delta(X_1) = -\Delta(X_2) - \Delta(X_3) = -\Delta(X_2)(1 + k_3/k_{-3})$$

$$\Delta(E) + \Delta(X_1) = \Delta(X_1)(1 + k_{-1}/\{k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\})$$

[см. уравнение (16.88)]

Выражая $\Delta(X_1)$ через $\Delta(X_2)$, получаем

$$\Delta(X_1) = -\Delta(X_2)(1 + k_3/k_{-3})/(1 + k_{-1}/\{k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\})$$

Поэтому

$$\begin{aligned} -d[\Delta(X_2) + \Delta(X_3)]/dt &= -(d\Delta(X_2)/dt)(1 + k_3/k_{-3}) \\ &= (k_2(1 + k_3/k_{-3})/\{1 + k_{-1}/k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\} + k_{-2})\Delta(X_2) \end{aligned}$$

и

$$-d\Delta(X_2)/dt = \Delta X_2/\tau$$

где

$$1/\tau = k_2/\{1 + k_{-1}/k_1[(\bar{E}) + (\bar{S})]\} + k_{-2}/(1 + k_3/k_{-3})$$

ГЛАВА 17

17.1. Оба неправы. В рамках модели МУШ отсутствие изменений P при связывании I должно означать, что первоначально фермент находится в состоянии T . Если это так, то присоединение S' к ферменту в R -состоянии должно приводить к изменениям P , которые в свою очередь должны вызывать изменения $y_{S'}$, но не параллельные [см. уравнение (17.18) и следующее за ним обсуждение; см. также разд. 17.4].

17.2. Предположим, что I связывается с ферментом только в состоянии T , а A — только в состоянии R . Данные можно было бы объяснить, если $L = 1$: почти гиперболическое связывание только A или только I , но сигмовидный характер связывания A в присутствии I имеет место из-за того, что I переводит белок в состояние T . Обратное справедливо для I в присутствии A . Если же $L \gg 1$, то связывание одного A должно иметь сигмовидный, а не гиперболический характер. Следовательно, доктор Альфа не прав. Доктор Омега также не прав, так как он упускает из виду, что случай, когда $L = 1$, является решением.

17.3. Обозначим состояния в верхнем ряду через I_0, I_1, I_2 и I_3 , а состояния в нижнем ряду — через R_i , где $i = 0 - 4$. Параметр L равен $(I_0)/(R_0)$. По аналогии с уравнениями (17.9) — (17.12) имеем

$$\begin{aligned} \sum_{i=0}^4 (R_i) &= (R_0)(1 + \alpha)^4 \\ \sum_{i=0}^3 (I_i) &= (I_0)[(1 + c\alpha)^4 - c^4\alpha^4] = L(R_0)[(1 + c\alpha)^4 - c^4\alpha^4] \\ \sum_{i=0}^4 i(R_i) &= 4\alpha(R_0)(1 + \alpha)^3 \\ \sum_{i=0}^3 i(I_i) &= 4Lc\alpha(R_0)[(1 + c\alpha)^3 - c^3\alpha^3] \\ \bar{y} &= \left[\sum_{i=0}^4 i(R_i) + \sum_{i=0}^3 i(I_i) \right] / \left[4 \left(\sum_{i=0}^4 (R_i) + \sum_{i=0}^3 (I_i) \right) \right] \\ &= \{[\alpha(1 + \alpha)^3 + Lc\alpha[(1 + c\alpha)^3 - c^3\alpha^3]] / [(1 + \alpha)^4 + L(1 + c\alpha)^4 - c^4\alpha^4]\} \end{aligned}$$

Это уравнение можно сопоставить с уравнением (17.13), которое справедливо для модели МУШ. Эти два уравнения очень схожи, за исключением того, что в приведенном выше уравнении в числителе и в знаменателе вычитается еще один член. По-видимому, едва ли можно было бы на основании экспериментов обнаружить различие между двумя этими выражениями для $\bar{y}$. Параметр r_i равен

$$r_i = (I_i)/(R_i) = Lc^i$$

При $L = 10^3$, $c = 10^{-2}$ $r_i < 1$ для $i = 2, 3$. При $L = 10^4$, $c = 10^{-2}$ $r_i < 1$ для $i = 3$.

17.4. Пусть $\alpha = (L)/k$ и $\alpha' = (A)/k_A$. Тогда

$$(PL_1) = 4\alpha(P)$$

$$(PL_2) = 6\alpha^2(P)$$

$$(PL_3) = 4\alpha^3(P)$$

$$(PL_4) = \alpha^4(P)$$

$$\bar{y} = \sum_{i=0}^4 i(PL_i)/4 \left[\sum_{i=0}^4 (PL_i) \right]$$

Заметим, что $(PL_0) = (P) + (PA)$; $(PA) = \alpha'(P)$. После упрощений имеем

$$\bar{y} = \alpha(1 + \alpha)^3 / [(1 + \alpha)^4 + \alpha']$$

Это уравнение идентично по форме уравнению (17.16), причем α' в написанном выше уравнении играет роль константы L в уравнении (17.16). Следовательно, точно так же как увеличение L влияет на зависимость $\bar{y}$ от α в уравнении (17.16), возрастание (A) (т.е. α') приведет к сильно выраженной сигмоидности зависимости $\bar{y}$ от α .

Для значений K_i мы имеем

$$K_1 = [(P) + (PA)](L)/(PL_1) = (k/4)(1 + \alpha')$$

$$K_2 = (2/3)k, K_3 = (3/2)k, \text{ and } K_4 = 4k$$

От концентрации A зависит только константа K_1 . По мере увеличения A константа K_1 становится все больше и больше, так что

$$K_1/K_2 = 3/8, \text{ когда } \alpha' = 0$$

$$= 3/4, \text{ когда } \alpha' = 1$$

$$= 15/4, \text{ когда } \alpha' = 9$$

Следовательно, связывание первой молекулы по сравнению со связыванием следующей молекулы становится все слабее по мере увеличения α' . Как уже отмечалось выше, это приводит к появлению кажущихся кооперативных свойств у системы, в которой нет кооперативных взаимодействий между местами связывания лигандов.

17.5. Если $L \gg 1$, $c = 0$ для A и $c \gg 1$ для B , то первые два пункта будут выполняться. Однако связывание только B должно быть гиперболическим (первоначально белок находится в состоянии T , когда возможно связывание B). Таким образом, эти данные нельзя объяснить моделью МУШ.

ГЛАВА 18

18.1. Прежде всего найдем знаменатель уравнения (18.23):

$$\int_0^\infty W(r) dr = (\beta/\pi^{1/2})^3 \int_0^\infty e^{-\beta^2 r^2} 4\pi r^2 dr$$

$$\int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} r^2 dr = (1/4\beta^2)(\pi^{1/2}/\beta) = (\pi^{1/2}/4\beta^3)$$

Поэтому

$$4\pi \int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} r^2 dr = (\pi^{3/2}/\beta^3)$$

и

$$(\beta/\pi^{1/2})^3 \int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} 4\pi r^2 dr = 1$$

Таким образом, функция распределения является нормированной.

Для числителя уравнения (18.23) имеем

$$\begin{aligned} \int_0^{\infty} r^2 W(r) dr &= (\beta/\pi^{1/2})^3 \int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} 4\pi r^4 dr \\ \int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} r^4 dr &= (3/8\beta^4)(\pi^{1/2}/\beta) = (3\pi^{1/2}/8\beta^5) \end{aligned}$$

Поэтому

$$4\pi \int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} r^4 dr = (3\pi^{3/2}/2\beta^5)$$

и

$$(\beta/\pi^{1/2})^3 \int_0^{\infty} e^{-\beta^2 r^2} 4\pi r^4 dr = (3/2\beta^2)$$

Поскольку $\beta^{-1} = (2nl^2/3)^{1/2}$, то $3/2\beta^2 = nl^2 = \langle r^2 \rangle_0$.

18.2. Идея статистического сегмента состоит в том, что цепь может рассматриваться как эквивалентная свободно-сочлененная цепь из N_3 сегментов длины l_3 (см. разд. 18.9). Вероятность $p(N_3)$ того, что концы окажутся на расстоянии от 0 до l_3 один от другого, равна

$$p(N_3) = \int_0^{l_3} W(r) dr$$

где $W(r) = (\beta/\pi^{1/2})^3 e^{-\beta^2 r^2} 4\pi r^2$ [см. уравнение (18.22)], а $\beta = (3/2N_3 l_3^2)^{1/2}$. Поскольку $N_3 > 30$, $\beta^2 r^2 \approx 0$ для $r < l_3$ и $e^{-\beta^2 r^2} \approx 1$. Поэтому

$$p(N_3) \cong (\beta/\pi^{1/2})^3 \int_0^{l_3} 4\pi r^2 dr = (\beta/\pi^{1/2})^3 4\pi l_3^3/3 = k\beta^3$$

где k является константой. Далее, поскольку

$$\beta^3 = k' N_3^{-3/2}$$

где k' — константа, имеем

$$p(N_3) = k k' N_3^{-3/2}$$

Учитывая, что $M \propto N_3$, получаем окончательно,

$$p(M) \propto \text{const } M^{-3/2}$$

18.3. $\langle r^2 \rangle$ вычисляется по формуле (18.4). Виртуальная связь i соединяет атом α -углерода ($i - 1$)-го остатка с α -углеродом i -го остатка (см. разд. 18.6). Виртуальные связи, которые соединяют k -й и p -й остатки, имеют индексы от $k + 1$ до p . Поэтому для вычисления $\langle r_{kp}^2 \rangle$ нам необходимо провести следующее суммирование:

$$\begin{aligned} \langle r_{kp}^2 \rangle &= (p - k)l^2 + 2 \left\langle \sum_{j>i} (\hat{\mathbf{r}}_i \cdot \hat{\mathbf{r}}_j) \right\rangle \\ &= (p - k)l^2 + 2 \left\langle \sum_{j=i+1}^p \sum_{i=k+1}^p (\hat{\mathbf{r}}_i \cdot \hat{\mathbf{r}}_j) \right\rangle \end{aligned}$$

Таким образом, преподаватель был неправ, поскольку в предлагаемом им выражении суммирование по i начиналось с k , а не с $(k + 1)$.

18.4. Да. Хотя цепь со свободным вращением стремится принимать конформации, при которых ее размер становится сравнительно небольшим, возможна ситуация, когда цепь с ограниченным вращением будет иметь даже меньшие средние размеры. Вопрос в том, способствует ли ограничение вращения реализации более компактных структур за счет более вытянутых. Это может произойти в том случае, когда между элементами цепи существует притяжение, способствующее тому, чтобы углы внутреннего вращения принимали значения, соответствующие менее вытянутым конформациям. Таким образом, хотя в цепи со свободным вращением реализуются с равной вероятностью все значения углов внутреннего вращения, в цепи с ограниченным вращением могут в принципе чаще встречаться те углы внутреннего вращения, которые отвечают более компактным структурам.

18.5. При $n = 2$ или 3 конформационная гибкость цепи оказывается недостаточной, чтобы при сближении заряженных концов становилось более выгодным образование компактных структур. Это связано с тем, что при данных n слишком небольшое число углов ϕ и ψ влияет на конформации, набор которых определяется стерическими ограничениями.

При больших n может существовать больше стерически допустимых конформаций, а электростатическое притяжение между концами цепи благоприятствует образованию структур, в которых концы могут взаимодействовать. Поэтому учет электростатического взаимодействия между концами цепи приводит к существенным расхождениям между вычисленными и наблюдаемыми значениями расстояний между концами для цепей, состоящих более чем из трех остатков. Более подробно эта проблема рассмотрена в работе Flory P. J., Schimmel P. R., J. Am. Chem. Soc., 89, 6807, 1967.

ГЛАВА 19

19.1. Выражение для коэффициента седиментации дает формула (19.22). Если $\bar{V}_2$ эквивалентной сферы и статистического клубка одинаковы, то одинаковые значения s^0 получаются только в том случае, если у обеих форм одинаковые коэффициенты трения.

Для статистических клубков f рассчитывают по формуле (19.21), а формула (19.20) дает нам выражение для f эквивалентной сферы. Приравняв эти выражения друг другу и выразив из полученного уравнения радиус r_s эквивалентной сферы, имеем

$$r_s = (P_{\text{кл}} \langle r^2 \rangle^{1/2}) / 6\pi = 27,1 \text{ \AA}$$

19.2. Если мы обратимся к табл. 19.1 и 19.2, то увидим, что такой результат, когда величина $s^0 [\eta]^{1/3}$ пропорциональна $M^{2/3}$, может получиться в случае жесткой сферы, а также тонкого диска и длинной цепи, свернутой в статистический клубок (в обеих моделях — возмущенной и невозмущенной цепи).

19.3. Средний квадрат расстояния между концами цепи находим по формуле

$$\langle r^2 \rangle = \left(\int_0^\infty \exp(-ar^2/kT) 4\pi r^4 dr \right) / \left(\int_0^\infty \exp(-ar^2/kT) 4\pi r^2 dr \right)$$

Выполнив интегрирование и упростив выражение, получаем

$$\langle r^2 \rangle = 3kT/2\alpha$$

Если известна характеристическая вязкость, мы можем вычислить $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ по формуле (19.18). Выполнив расчеты, получаем $\langle r^2 \rangle^{1/2} = 350 \text{ \AA}$. Соотношение, которое мы здесь вывели, позволяет нам вычислить α , если известны $\langle r^2 \rangle$ и kT . Отсюда находим, что при 300 К $\alpha = 50,7 \text{ эрг/\AA}^2$.

19.4. Так как $L_{\text{кл}} \gg a$, то вместо уравнения (19.41) мы можем воспользоваться уравнением (19.42). Если выражать $\langle r^2 \rangle_0^{1/2}$ в мкм (1 мкм = $10^4 \text{ \AA}$), то

$$\langle r^2 \rangle_0^{1/2} = (2aL_{\text{кл}})^{1/2} = [(2)(0,045)(60)]^{1/2} = 2,3 \text{ мкм}$$

19.5. Вычислим $\langle r^2 \rangle$, воспользовавшись формулой (19.19). Получим $\langle r^2 \rangle = 8,7 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2$, или $\langle r^2 \rangle^{1/2} = 2,95 \cdot 10^{-5} \text{ см} = 2950 \text{ \AA}$. Так как $\langle r^2 \rangle^{1/2} \ll L_K$, то и a , как мы знаем, должна быть много меньше L_K . Поэтому для вычисления a по известным $\langle r^2 \rangle$ и L_K мы можем воспользоваться уравнением (19.42). Отсюда находим $a = 145 \text{ \AA}$. Заметим, что это лишь приближенная оценка a , поскольку мы подставили в (19.42) величину $\langle r^2 \rangle$, а не $\langle r^2 \rangle_0$.

ГЛАВА 20

20.1.

$$k_1 = (\Omega_{20} \sigma s^{20}) / (\Omega_{50} \sigma s^{50})$$

$$k_2 = (\Omega_{25} \sigma s^{25}) / (\Omega_{75} \sigma s^{75})$$

где Ω_k определяется по формуле (20.27).

При $\sigma = 10^{-4}$ и $s = 1$ имеем

$$k_1 = \Omega_{20} / \Omega_{50} = 81/51$$

$$k_2 = \Omega_{25} / \Omega_{75} = 76/26$$

20.2. Пусть ΔG_1 и ΔG_2 — значения свободной энергии для спиралей 1 и 2, определяемые относительно полностью неупорядоченного состояния. Тогда

$$\Delta G_1 = -RT \ln \sigma s^{100} \quad \text{и} \quad \Delta G_2 = -RT \ln \sigma' s'^{100}$$

Если мы положим $\Delta G_1 - \Delta G_2 = 0$ и используем данные значения σ и s'/s , чтобы найти σ' , то получим $\sigma' = 10^{-2}$.

20.3. Нужно провести непосредственное перемножение матриц.

20.4. Нужно провести прямое дифференцирование.

20.5. Составим для каждого остатка типа А и типа В матрицу, которая определяется по формуле (20.39). В результате получим

$$q = (1, 0) M_A M_B M_A M_B \dots \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

где

$$M_A = \begin{pmatrix} 1 & \sigma_A s_A \\ 1 & s_A \end{pmatrix}$$

$$M_B = \begin{pmatrix} 1 & \sigma_B s_B \\ 1 & s_B \end{pmatrix}$$

Мы можем также представить q следующим образом:

$$q = (1, 0) (M_A M_B)^x \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

где $x = n/2$ и $M_A M_B = Q$ есть

$$Q = \begin{pmatrix} 1 + \sigma_A s_A & \sigma_B s_B + \sigma_A s_A s_B \\ 1 + s_A & \sigma_B s_B + s_A s_B \end{pmatrix}$$

ГЛАВА 21

21.1. Начните с уравнения (21.16), используя для $K_{\text{каж}}$ формулу (21.15). Это даст

$$d \ln K_{\text{каж}} dT = d \ln K_D/dT + d \ln \left(1 + \sum_i d_i K_i/K_D \right) / dT - d \ln \left(1 + \sum_i (1 - d_i) K_i \right) / dT$$

Далее выполните дифференцирование, используя соотношения $d \ln K_D/dT = \Delta H_D/RT^2$ и $d \ln K_i/dT = \Delta H_i/RT^2$. Выполнив необходимые преобразования, получим уравнение (21.17).

21.2. Для каждой физической величины мы измеряем $f_{\text{каж}}$. Мы можем вычислить, какие значения $f_{\text{каж}}$ должны соответствовать каждой из d_i , используя (21.10) и значения K (чтобы рассчитать f_x). Получаются три значения $f_{\text{каж}}$, соответствующие $f_D = 0,2, 0,5$ и $0,8$, для $d_1 = 0,1$ и $d_1 = 0,2$ (последние указаны в скобках): $0,22$ ($0,24$); $0,52$ ($0,54$) и $0,81$ ($0,82$). Поскольку для всех f_D значения $f_{\text{каж}}$ различаются не более чем на ошибку эксперимента, их нельзя различить экспериментально. А так как в результате двух измерений данной физической величины мы получаем в пределах ошибки эксперимента одинаковые значения в трех разных точках в процессе денатурации, мы можем ошибочно заключить, что промежуточные состояния отсутствуют.

24.3. ΔH , ΔS и ΔC_p можно найти из основных термодинамических уравнений:

$$\Delta H = -T^2 [\partial(\Delta G/T)/\partial T]_p = a - cT^2$$

$$\Delta S = -(\partial \Delta G/\partial T)_p = -b - 2cT$$

$$\Delta C_p = (\partial \Delta H/\partial T)_p = T(\partial \Delta S/\partial T)_p = -2cT$$

В точке, где стабильность белка максимальна, должны выполняться соотношения $(\partial \Delta G/\partial T)_p = 0$ и $(\partial^2 \Delta G/\partial T^2)_p < 0$. (Последнее неравенство есть условие достижения максимума ΔG , а это в свою очередь означает, что свободная энергия денатурированной формы, отсчитываемая от свободной энергии нативного состояния, имеет максимальное значение. Это и есть условие максимальной стабильности нативной формы.) Дифференцируя выражение для ΔG , получаем

$$(\partial \Delta G/\partial T)_p = b + 2cT$$

Приравнявая $(\partial \Delta G/\partial T)_p$ нулю, имеем $T = -b/2c = 300 \text{ K} \cong 27^\circ\text{C}$. Вторая производная равна

$$(\partial^2 \Delta G/\partial T^2)_p = 2c$$

Поскольку c отрицательна, $(\partial^2 \Delta G/\partial T^2)_p < 0$, и, следовательно, мы имеем максимум ΔG при $T = 27^\circ\text{C}$.

21.4. Так как кинетические кривые, получаемые при 280 нм, одинаковы в присутствии репортерской группы и в ее отсутствие, вероятность того, что репортерская группа серьезно искажает структуру, очень мала. Тем не менее полученные результаты все еще трудно понять. Проблема заключается в том, что, когда репортерская группа связана с белковой молекулой, при регистрации ее поглощения наблюдается двухфазная кинетика в *обоих направлениях*, в то время как при наблюдении за поглощением той же молекулы при длине волны 280 нм получается однофазная кинетика в *обоих направлениях*. Однако у нас нет весьма важных данных — параметров скорости (λ) для разных кинетических фаз. Было бы полезно иметь параметр λ для кинетики, наблюдаемой по поглощению при 280 нм, и располагать данными о том, соответствует ли он какому-либо значению, наблюдаемому по поглощению репортерской группы.

21.5. Чтобы полностью описать эту систему, нужно только четыре переменных — концентрации или частичные (парциальные) концентрации. Пятая переменная представляется как линейная комбинация

ция этих четырех, а именно

$$\Delta f_{X_3} = -\Delta f_N - \Delta f_{X_1} - \Delta f_{X_2} - \Delta f_D$$

Следовательно, четыре уравнения скорости полностью описывают систему, что дает четыре параметра λ_i (число которых всегда равно числу независимых переменных). При исследовании реакции $N \rightarrow D$ мы видим только одну фазу, соответствующую медленному переходу $N \rightleftharpoons X_1$. Это объясняется тем, что первый этап гораздо медленнее всех последующих, и после его завершения равновесие устанавливается очень быстро. Однако для перехода $D \rightarrow N$ должны наблюдаться одна или больше быстрых фаз, которые являются «узким местом» для медленного процесса установления равновесия $X_1 \rightleftharpoons N$. Следовательно, при исследовании перехода $D \rightarrow N$ можно выявить помимо медленной фазы и быстрые.

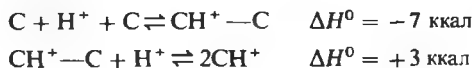
ГЛАВА 22

22.1. а. Измерьте кривую смешивания, откладывая на графике мольную долю остатков А или U. Резкое изменение наклона кривой при мольной доле 0,5 будет указывать на насыщение. Можно также попытаться выяснить, защищают ли олигомеры полимер от воздействия химических агентов или ферментов, специфичных к одноцепочечным полинуклеотидам.

б. Сравните гипохромизм комплекса $\text{oligo (A)} \cdot \text{poly (U)}$ с гипохромизмом $\text{poly (A)} \cdot \text{poly (U)}$ или сопоставьте их спектры КД.

в. Напомним, что стабильность комплекса всегда измеряется относительно стабильности его изолированных компонент. Хотя структура рассматриваемых комплексов одинакова, энергетические потери при диссоциации олигомеров оказываются различными. В случае oligo (A) утрачивается сильное межплоскостное взаимодействие между соседними олигомерами; в случае же oligo (U) стэкинг-взаимодействие значительно слабее. Поэтому комплекс $\text{oligo (A)} \cdot \text{poly (U)}$ оказывается значительно более стабильным.

22.2. Следуя указанию, запишем



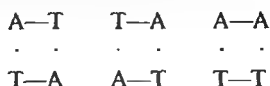
Теперь воспользуемся уравнением (22.206), рассматривая H^+ как переменную:

$$\partial T_m / \partial \text{pH} = \Delta n_p R T_m^2 / \Delta H_p^0$$

Изменение энтальпии в расчете на фосфат равно половине от указанных величин. Изменение в числе связанных протонов на фосфат составляет $+1/2$ для каждой реакции. Поэтому $\partial T_m / \partial \text{pH}$ отрицательна для верхней реакции и положительна для нижней. Эти две линии раздела фаз должны сойтись при pH, которое соответствует максимальной возможной T_m . Выше этой температуры кислая форма двойной спирали нестабильна при всех pH. pH, при котором можно было бы наблюдать два температурных перехода, не существует.

22.3. Этот вопрос на самом деле не так прост. Лучше всего было бы использовать олигонуклеотиды определенной длины. Тогда концентрационная зависимость условий образования спирали позволила бы определить число цепей в комплексе. Есть и другая возможность: исследовать кинетику релаксации. Измерения зависимости образования комплекса от длины могут помочь отличить параллельные структуры от антипараллельных. В то время как взаимодействие параллельных цепей обязательно должно быть межмолекулярным (исключая протяженные структуры, которые могут образовывать циклы), антипараллельные взаимодействия возможны в одной цепи при ее сворачивании с образованием шпильчатой структуры. Для таких внутримолекулярных комплексов концентрационная зависимость при исследованиях кривых плавления и кинетики релаксации будет отсутствовать.

22.4. Имеются три различных взаимодействия:



Существует одно ограничение на долю разных контактов, связанное с тем, что число переходов в последовательности от А к Т должно быть равно числу переходов от Т к А: $\chi_{AT} = \chi_{TA}$. Таким образом, существуют только две независимые переменные. Использование $\text{poly}(A) \cdot \text{poly}(T)$ и $\text{poly}(A-T) \cdot \text{poly}(A-T)$ дает всю необходимую информацию для определения этих переменных.

22.5. Можно думать, что петля будет мигрировать вдоль двойной спирали и это приведет к быстрому обмену трития. Хотя кинетика движения таких петель неизвестна, для получения грубой оценки можно считать, что она примерно такая же, как при миграции одноцепочечных ветвлений (см. гл. 23). Скорость последней составляет около 1000 пар в 1 с, что может приводить к совершенно иным скоростям тритиевого обмена.

ГЛАВА 23

23.1. Ответы на вопросы, поставленные в пп. а и б, можно получить прямым вычислением.

в. Необходимо последовательно рассмотреть каждый элемент. Например, $M_{12} = 0$, поскольку, если оба места 1 и 2 не заняты, то не существует состояния для мест 2 и 3, в котором место 2 было бы заполнено. Отметим, что элемент M_{42} определен неоднозначно: он может быть равен 1 или 0. Это, однако, не имеет значения, поскольку получающиеся матрицы в обоих случаях имеют одни и те же собственные числа.

г. Необходимо решить уравнение

$$\begin{vmatrix} 1 - \lambda & 0 & k(m) & 0 \\ 1 & -\lambda & \zeta k(m) & 0 \\ 0 & 1 & -\lambda & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -\lambda \end{vmatrix} = 0$$

которое сводится к кубическому уравнению $-\lambda^3 + \lambda^2 + \lambda \zeta k(m) + (1 - \zeta) k(m) = 0$. В пределе $\zeta \rightarrow 1$ это уравнение переходит в $-\lambda^3 + \lambda^2 + \lambda k(m) = 0$, которое можно переписать в виде

$$\lambda^2 - \lambda = k(m)$$

Чтобы сопоставить этот результат с приведенным в тексте, следует рассмотреть уравнение (23.101). Положим параметр ζ в этом уравнении (который имеет иной смысл, чем параметр ζ в рассматриваемой модели) равным 0. Тогда мы получим уравнение для модели с исключением мест связывания. Оно идентично приведенному выше уравнению.

23.2. На основании данных табл. 23.4 и 23.5 можно оценить следующие величины: изменение свободной энергии при образовании левой структуры из цепи без вторичной структуры

$$\Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{GG} + \Delta G_{GC} + \Delta G_{CG} + \Delta G_{\text{петля}} \quad (10) = -6,1 \text{ ккал}$$

и при образовании правой структуры

$$\Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{GA} + \Delta G_{AA} + \Delta G_{AG} + \Delta G_{AA} + \Delta G_{GA} + \Delta G_{GG} + 2\Delta G_{\text{петля}} \quad (4) = -3,5 \text{ ккал}$$

Таким образом, изменение свободной энергии ΔG при переходе от левой структуры к правой составляет +2,6 ккал. Константа равновесия для этой реакции при 25°C равна $K = e^{-2,6/0,6} = 0,013$. Этот пример показывает, что конкретная последовательность пар оснований в спиральных участках, а также число и размер петель в структуре оказываются значительно более важными, чем общее число пар оснований.

23.3. Повторяющаяся последовательность присутствует в количестве 5000 копий на геном, и она будет ренатурировать с $(C_0t)_{1/2}$, составляющим 1/5000 соответствующей величины для уникальной последовательности. Если ДНК разрезана на фрагменты по 60 пар оснований, уникальные и повторяющиеся последовательности будут ренатурировать почти полностью независимо. При фрагментации до 300 пар оснований большая часть уникальных последовательностей окажется во фрагментах, со-

державших участки повторяющихся последовательностей, и будет ренатурировать с $(C_0f)_{1/2}$, соответствующим этим повторам. При дроблении ДНК на фрагменты еще большей длины весь препарат будет ренатурировать со скоростью, характерной для повторяющихся последовательностей.

23.4. За увеличение стабильности могут быть ответственны по крайней мере три фактора: 1) стэкинг соседних оснований в петлях, зависящий, по-видимому, от коикретной последовательности; 2) контакты с другими участками тРНК; 3) само существование петель, а не свободной одиночной цепи в комплементарных участках. Для проверки гипотезы 2 следует выделить антикодоновые шпильки из тРНК путем мягкой обработки нуклеазами и исследовать их взаимодействие. Для проверки предположения 3 можно было бы измерить взаимодействие между петлей и одиночной цепью, чтобы выяснить, является ли оно и в этом случае более сильным, чем следует ожидать, исходя из известной стабильности простых двойных спиралей. Однако для более адекватной оценки правильности гипотез 1 и 3 следовало бы, вероятно, получить синтетические петли из 6, 7 или 8 звеньев со специфическими последовательностями или получить мутантные тРНК с модифицированными основаниями или другими изменениями в антикодовой петле. Активно занимались такими исследованиями Грозьян и Крозерс (H. Grosjean, D. Crothers) с сотрудниками.

23.5. По условию задачи $\Delta G_{\text{нукл}}$ равно +4 ккал. Для вычисления полной свободной энергии образования олигонуклеотидных комплексов при заданной температуре и нахождения концентрации цепей, при которой эта температура будет соответствовать T_m , можно использовать уравнение (23.196):

$$\Delta G_{\text{полн}} = -RT \ln q_k = -RT \ln(4/C_{\text{полн}})$$

На основании приведенных данных можно записать следующие соотношения:

$$\text{AATAA} \cdot \text{TTATT} \quad \Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{\text{нукл}} + 2\Delta G_{\text{AA}} + \Delta G_{\text{AT}} + \Delta G_{\text{TA}} = -2,92 \text{ ккал}$$

$$\text{ATATA} \cdot \text{TATAT} \quad \Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{\text{нукл}} + 2\Delta G_{\text{AT}} + 2\Delta G_{\text{TA}} = -3,59 \text{ ккал}$$

$$\text{AAAAT} \cdot \text{ATTTT} \quad \Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{\text{нукл}} + 3\Delta G_{\text{AA}} + \Delta G_{\text{AT}} = -2,10 \text{ ккал}$$

Решение этой системы уравнений дает $\Delta G_{\text{AA}} = -1,56$ ккал; $\Delta G_{\text{AT}} = -1,42$ ккал; $\Delta G_{\text{TA}} = -2,37$ ккал. Используя эти величины, можно вычислить

$$\text{TAAAA} \cdot \text{TTTTA} \quad \Delta G_{\text{полн}} = \Delta G_{\text{нукл}} + 3\Delta G_{\text{AA}} + \Delta G_{\text{TA}} = -3,05 \text{ ккал}$$

ГЛАВА 24

24.1. ДНК с такой молекулярной массой содержит примерно 9090 пар оснований. Если молекула ДНК представляет собой релаксированную кольцевую замкнутую двойную спираль в В-форме, то в ней насчитывается 909 витков. После перехода в А-форму в той же ДНК в релаксированном состоянии имеется всего 826 витков. Поэтому остальные 83 взаимных переплетения двух цепей должны реализоваться в виде 83 положительных сверхвитков. Если эту ДНК в А-форме релаксировать, а затем перевести снова в В-форму, то она будет стремиться образовать дополнительно 83 витка двойной спирали, что приведет к возникновению 83 отрицательных сверхвитков.

24.2. Структура справа та же, что в примере И, за исключением того, что витки здесь левые, а не правые. Поэтому $L = -2$, а $T = -2 \sin \theta$. У изображенной слева структуры величина кручения та же, что в примере О: $T = -2 \sin \theta$. Однако из-за добавочной петли с нулевым кручением появляются два дополнительных зацепления со знаком плюс, так что $L = +4$.

24.3. При решении этой задачи полезно обратиться к рис. 24.8.

а. Тот факт, что количество связанного этидия уменьшается, показывает, что в исходной ДНК сверхспирализация была отрицательной и что количество красителя в ДНК недостаточно для ее полной релаксации. Зная, насколько уменьшилось содержание этидия в ДНК, мы можем оценить, как далеко от релаксированного состояния находится структура, но не сможем найти число исходных сверхвитков.

6. Поскольку количество связанного этидия не изменилось, $\bar{\nu} = \bar{\nu}_{\text{кр}}$. ДНК полностью релаксирована. Используя для величины угла раскручивания ДНК одной молекулой этидия значение -26° , получаем, что 169 молекул связанного этидия на молекулу ДНК соответствуют 12 отрицательным сверхвиткам.

24.4. Заметим, что в общем случае четыре точки в пространстве образуют неправильный тетраэдр, который представляет собой жесткую конструкцию. Поэтому их взаимное расположение полностью определяется шестью расстояниями между ними. Для того чтобы однозначно определить положение пятой точки по отношению к этим четырем, требуется задать еще четыре расстояния: три определяют ее положение относительно трех вершин одной из граней, но мы не сможем сказать, по какую сторону грани она находится. Те же рассуждения применимы к шестой точке и ко всем последующим. Ответ на дополнительный вопрос неизвестен (по крайней мере авторам).

24.5. а. Приняв за основу сведения, содержащиеся в основном тексте, мы приходим к заключению, что линии на участке спектра от -14 до -15 м.д. должны принадлежать AU-парам. Если бы это была изолированная пара, то соответствующая ей линия находилась бы при значении $-14,8$ м.д., но соседние пары вызовут сдвиг этой линии в сторону больших полей; величину этого сдвига можно рассчитывать на основе данных, представленных в табл. 24.1. Выполнив соответствующие расчеты, мы получим для структуры, изображенной слева, одну линию в указанной области спектра, для средней структуры — две и для той, что справа, — три. Так что в принципе с помощью метода ЯМР мы можем отличить эти три структуры друг от друга.

б. AAGG будет связываться с левой и правой структурами, но не со средней. CCUU, GUGG, CCUA и ряд других будут связываться только с левой структурой.

в. Панкреатическая рибонуклеаза разрывает цепь РНК после пиримидинов. Из всего набора фрагментов, на которые она разобьет данную последовательность, наиболее полезным при анализе этих трех структур с помощью водородно-трипиевого обмена оказывается фрагмент AAGGU. В левой структуре все четыре пурина этого фрагмента экспонированы, в средней все они спарены с другими основаниями и в правой — лишь один А экспонирован в раствор.

г. Кинетика плавления левой структуры должна описываться простой экспоненциальной зависимостью, тогда как для правой структуры должно получиться два времени релаксации, а в случае средней структуры может оказаться даже три времени релаксации.

ГЛАВА 25

25.1. Из уравнения (25.14) имеем

$$\pi = (RT/M)\hat{c}_1 + (RT/2M)\hat{c}_2$$

Мы можем выразить $\hat{c}_2$ через $\hat{c}_1$

$$K = (M_1)^2 (M_2) = (\hat{c}_1 / M)^2 / (\hat{c}_2 / 2M)$$

и

$$\hat{c}_2 = 2\hat{c}_1^2 / KM$$

Далее $c = \hat{c}_1 + 2\hat{c}_2 = \hat{c}_1 + 4\hat{c}_1^2 / KM$, откуда $\hat{c}_1 \equiv \hat{c} - 4\hat{c}^2 / KM$.

Окончательно имеем

$$\pi \equiv (RT/M)\hat{c} - 3(RT/KM^2)\hat{c}^2$$

откуда

$$B = -3/KM^2$$

25.2. Обратимся к разделу, где рассмотрен эффект Доннана. Со стороны 1 мембраны $(\text{Na}^+)^{(1)} = (\text{Cl}^-)^{(1)} = 10$ мкМ. Так как $(\text{Cl}^-)^{(2)} = 50$ мкМ, то $r_D = 5$ [см. (25.216)]. Теперь по формуле (25.25) вычислим r_D , используя значение $z(M) = 99$ мкМ и $(s) = 10$ мкМ. Получаем, что $r_D \cong 10$. Следовательно, система не находится в термодинамическом равновесии, поскольку опреде-

ляемое экспериментально значение r_D (равное 5) не согласуется с вычисленным в предположении, что система находится в равновесии.

25.3. Пусть r — расстояние от центра сферического пузырька до его наружной поверхности. Объем бислойной оболочки пузырька равен

$$\begin{aligned} (4/3)\pi r^3 - (4/3)\pi(r - 2l)^3 &= (4/3)\pi(6lr^2 - 12l^2r + 8l^3) \\ &= 4\pi r^2[2l - 4l(l/r) + (8/3)l(l^2/r^2)] \end{aligned}$$

Объем плоского бислоя есть $A_n \cdot 2l$, где A_n — площадь одной поверхности. Так как объем обоих бислоев (сферического и плоского) по предположению равны, мы получаем

$$\begin{aligned} A_n \cdot 2l &= 4\pi r^2[2l - 4l(l/r) + (8/3)l(l^2/r^2)] \\ A_n &= 4\pi r^2[1 - 2(l/r) + 4/3(l^2/r^2)] \end{aligned}$$

Площадь наружной поверхности сферы равна $4\pi r^2$. Ясно, что если $l/r \ll 1$, то $A_n \cong 4\pi r^2$ и утверждение правильно.

25.4. См. разд. 25.3. Повышение концентрации NaCl способствует более тесной упаковке заряженных ионных головок. Это в свою очередь приводит к образованию мицелл такой формы, при которой возможна более плотная упаковка (например, цилиндрическая форма или плоский бислой). Этим формам свойственно увеличение размеров без существенного изменения отношения площади поверхности мицеллы к числу головок. Таким образом, можно ожидать, что при низкой ионной силе будут образовываться глобулярные или сферические мицеллы, у которых расстояние между головками относительно велико, а с повышением ионной силы будет происходить резкий переход к структурам, все более далеким от сферических. Размер этих структур может существенно увеличиваться, и при этом будут образовываться удлинённые мицеллы или бислои.

25.5. В бислое может наблюдаться два типа вращения белковой молекулы. Во-первых, это вращение вокруг длинной оси цилиндра, и оно должно быть быстрым. При этом внутрь мицеллы, где содержится аскорбиновая кислота, попадает большинство парамагнитных центров. Это есть быстрая фаза затухания сигнала ЭПР. Другая фаза определяется переворотом молекулы, при этом аскорбиновой кислоте становятся доступны оставшиеся парамагнитные центры на концах молекулы белка.

Предметный указатель

Агарозный гель, электрофорез ДНК 405

Агрегация цепей при ренатурации полинуклеотидов 277

Адаптация к большим высотам 114

Актиномицин D, взаимодействие с динуклеотидами 378—379

— модель связывания с ДНК 375

— структура 360

— — комплекса с dG 375, 377—378

L-аланин как «гость» в экспериментах типа «хозяин—гость» 205

— спектры ДОВ случайных сополимеров 179—180

Аллостерические активаторы 97—98

— — в модели МУШ 97—98

— белки 37—91

— — альтернативные модели 102—104

— — модель МУШ 91—98

— — общая схема 103—104

— — последовательная модель 102—104

— ингибиторы 88

— — взаимодействие с АКТазой 88—90

Амидные группы, ориентация диполей в α -спиралях 187—188

Аминокислоты, способность к встраиванию в α -спираль 204—206

Амплитудные параметры и разграничение механизмов сворачивания белков 225—226

Амфифильные вещества, образование мицелл 455

Антикооперативное связывание, график Скэтчарда 363

Антикооперативность в аллостерических системах 102—103

Апуриновая кислота 170

Аскорбиновая кислота, восстановление нитроксида 417

Аспартатаминотрансфераза, константы скорости взаимодействия с лигандами 69—70

Аспартат-карбамоилтрансфераза (АКТаза), активирование 91

— влияние аллостерического ингибитора 88—90

— — конкурентного ингибитора 90—91

— изучение каталитических субъединиц 100—101

— ингибирование по типу обратной связи 87

— как аллостерический белок 87—91, 100—102

— конформационное титрование 100—102

— субъединицы 91

Бактериофаг λ , концентрация концов молекулы ДНК 386

— — плотность сверхвитков замкнутой ДНК 407

— — свойства репрессора 361

— — связывание ДНК с РНК-полимеразой 407

— — формы ДНК 383—387

— MS2, структура РНК 437—438

— T2, изменение поглощения света при разделении цепей ДНК 344

— — кинетика денатурации ДНК 345

— — персистентная длина ДНК 176

— T4, белок гена 32 362

— — кинетика ренатурации ДНК 350

— — конденсация ДНК 304

— ϕ X174, обнаружение кольцевой ДНК 384

- Белки, денатурация 216—218, 221—223
— конформационные состояния, сравнение с нуклеиновыми кислотами 239—240
— разиорачивание (денатурация), гипотетические схемы 215
— — модель двух состояний 211—215
— сворачивание (ренатурация), гипотетические схемы 215
— — кинетические исследования 220—225
— — при реокислении 234—235
— связывающиеся с нуклеиновыми кислотами 361
— физические свойства и кинетика сворачивания 221—226
— — — частичная денатурация 215—218
 ω -Белок *E. coli*, свойства 408
Бензопирен, структура 360
Бислой, изгибание алифатических цепей 472—474
— микросреда 479
— образование 461—462
— относительная подвижность различных участков 477—479
— отношение площади поверхности к числу головок 459—461
— полярность 474—475
— структура и функции 462—481
Бора эффект 108—111
— — и боровские протоны 119
5-бромпириимидины как аналог пиримидинов 288
Быстрые реакции, методы исследования 55, 68—71

Вант-Гоффа кривые для β -лактоглобулина 214
— уравнение, анализ кривых плавления олигонуклеотидных комплексов 325
— — вычисление энтальпии стэкинга 259
— — и влияние связывания лиганда на плавление полинуклеотида 269
— — — кооперативность 261—262
Взаимно переплетенные витки, схема 390
Взаимодействие ближайших соседей, влияние на свойства ДНК 281
— между лигандами 364—366
— — — кооперативное и антикооперативное 365
— — — при связывании с нуклеиновыми кислотами 359—361
Внутримолекулярные расстояния и определение структуры 428
Водородные связи в α -спиралях 186
— — между актиномицином D и ДНК 377
Время жизни возбужденного состояния и характерное время образования стэкинга 334—335
— релаксации в случае двухстадийного механизма 63—64
— — — механизма с n промежуточными формами фермента 65—66
— — для бимолекулярной реакции 61
— — — бислоя 479
— — — плавления ДНК 344—345
— — — олигонуклеотидов 337
— — как функция равновесных концентраций 61
— — связь с константами скорости 61, 64
— — спаривания оснований 335
— спин-решеточной релаксации для ^{13}C в дипальмитоиллецитине 478
Вторичная структура 291
— — РНК, предсказание 330—332
— — фага MS2 гипотетическая 438
Вязкость раствора полинуклеотида, изменение при плавлении 276—278

Гель-электрофорез, определение числа сверхвитков в ДНК 405
Гемоглобин, боровские протоны 119
— взаимодействие с двуокисью углерода 114—116
— влияние органических фосфатов на кривую оксигенации 112—114
— концентрация промежуточных форм в процессе оксигенации 106—107

- кривые оксигенации 104—105
- механизм действия 118—119
- оценки значений рК для зависящих от кислорода процессов ионизации 111—112
- — — микроскопических констант связывания кислорода 106
- связь между структурой и механизмом действия 116—119
- солевые мостики 117—118
- Геном, определение размера по кинетике ренатурации 350
- Гетеротропные взаимодействия 92
- Гидродинамика полимерной цепи 159—176
- 2'-гидроксильная группа и структура одноцепочечных нуклеиновых кислот 243
- Гидроксипропил-L-глутамин, спектры ДОВ случайных сополимеров 179—180
- Гидрофобный барьер в липидном бислое 475
- Гипохроизм, влияние стэкинга 258
- гомополинуклеотидов 242
- и исследование кинетики денатурации ДНК 345
- — — плавления ДНК 342
- олигонуклеотидов 250
- Гистерезис при плавлении ДНК 342
- Гистидиновые остатки в рибонуклеазе 72—81
- — — роль в катализе 81
- — — ЯМР при денатурации рибонуклеазы 232—233
- Глицин, микроскопические состояния в процессе титрования 7
- расчет параметров, характеризующих размеры полимера 147—149
- Гомополимеры, агрегация цепей 277
- образование двухцепочечных комплексов 263
- Гомополинуклеотиды, гиперхромизм 242
- одноцепочечные упорядоченные структуры 241—242
- Гомотропные взаимодействия 92
- Двугранные углы вращения в статистике полимерных цепей 124—125
- Двуокись углерода, взаимодействие с гемоглобином 114—116
- Двухцепочечные олигонуклеотидные комплексы, исследование методом ЯМР 308—311
- — — оптическими методами 311—316
- — — кинетическая модель образования 336
- — — модели образования 316—319
- — — свободная энергия образования 324
- — — температура плавления 312
- полинуклеотидные комплексы и кривые смешивания 264—267
- — — как модельные системы 262—264
- — — перегруппировка цепей 270—271
- — — реакция замещения цепей 273
- Дебая—Хюккеля параметр экранировки 244, 284
- Дезоксигемоглобин, окружение гема 118
- солевые мостики 117
- сравнение с оксигемоглобином 117
- структурная схема молекулы 117
- Дезоксигуанозин в комплексе с актиномицином D 377—378
- Денатурация белков см. «Холодная» денатурация; Белки
- ДНК 343
- — схема 344
- Диаграмма состояний для конформаций тРНК 429—431
- 2,6-диаминопурин 288
- Динуклеозидфосфаты, гипохромизм 242
- спектры кругового дихроизма 251
- — — сопоставление со спектрами гомополинуклеотидов 242
- Динуклеотиды, комплексы с актиномицином D 378—379
- Дипальмитоиллецитин 478
- Диполь-дипольное взаимодействие амидных групп в α -спиралях 147—148
- — — — — энергия 187

- — — — — и длина α -спирали 187—188
- 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ), влияние на оксигенацию гемоглобина 113
- внутриклеточная концентрация 113
- молекулярный механизм связывания с гемоглобином 119
- структурная формула 112
- Диффузия и реакция переноса протона 293
- — сближение концов ДНК 385
- ДНК бактериофага T2, размер клубка 176
- В—А-переход 302
- взаимодействие с белками 361
- вируса полиомы 387, 397
- — SV40, определение числа сверхвитков 405
- — — связывание с этидием 401
- влияние нуклеотидного состава на температуру плавления и плавающую плотность 278—280
- высвобождение противоионов при плавлении 285
- денатурированная, расстояние между фосфатами 287
- D-петля 404
- зависимость коэффициента седиментации от молекулярной массы 171—172
- — характеристической вязкости от молекулярной массы 171
- картирование денатурированных областей 289
- кинетика денатурации 341—343
- кольцевая 383, 387
- конденсация с полимерами 304
- кривая связывания бромистого этидия 370
- кристаллы 304
- межмолекулярная ассоциация и циклизация 385
- модель Порода—Кратки 175—176
- обратимое и необратимое плавление 344
- оценка персистентной длины 172
- параметр кинетической сложности 350
- — определяющий скорость расплетания 345
- предплавление 303
- распределение повторов 357
- рост спиральной области 342
- — — — кинетика 348
- связывание противоионов 283—284
- седиментация и вискозиметрия 171—172
- структура комплекса с интеркалятором 372—377
- топология молекул 387—389, 391—394
- тритиевый обмен 295—297
- форма А, спектр КД 301
- — В, спектр КД 301
- — С, предплавление 303
- ДНК-лигаза 384
- и получение сверхспиральной ДНК 403
- ДНК-полимераза I 384
- Додецилсульфат, образование мицелл 455
- Доля связанных лигандов, определение 362—364
- — — — по графику Скэтчарда 363
- — — — с помощью статистической суммы 366
- Доннана эффект 450—452
- — величина доннановского отношения 451—452
- — влияние на трансмембранную разность pH 452—453
- Знак сверхспирали 389, 394
- — экспериментальное определение 397
- числа зацеплений 391
- Зонды 227. См. также Репортерские группы
- Иди—Хофсти* график 50
- Ингибирование аллостерическое 88—90, 97—98
- конкурентное 88—91
- по типу обратной связи 86—87
- — — — в метаболическом цикле пиримидина 87

- Инициация образования спирали в полипептидах 186
- Интеркаляция, детальная модель 377—378
- и изломы в молекуле ДНК 377
 - модель связывания ДНК с интеркалирующим агентом 371
 - структуры с интеркалированными основаниями в гомополимерах 248
- Ионная сила, влияние на одноцепочечные полинуклеотиды 244
- — — — плавление ДНК 282
 - — — — структуру тРНК^{Met} 430
 - — и предплавление ДНК 303
 - — фазовая диаграмма для системы poly (A) + poly (U) 271
 - — определение 244
- Исключенный объем, влияние на кинетику ренатурации ДНК 354
- — — — конденсацию ДНК 172
 - — — — коэффициент седиментации ДНК 172
 - — — — размеры цепи 154—155
 - — — — характеристическую вязкость ДНК 165
 - — и невозмущенное состояние 154
 - — — — тета-растворители 155
- Калориметрия 219—220
- тест на существование промежуточных состояний 218—220
- Канцерогены, связывание с нуклеиновыми кислотами 359
- 1-карбоксиметилгистидин 73—74
- Каталитическая эффективность и константа Михаэлиса 53
- Катенаны, электроинная микроскопия 396
- Кинетика конформационных изменений тРНК 431—432
- обмена протонов 294—296
 - образования олигонуклеотидной двойной спирали 336
 - — стэкинга 332—334
 - — шпилек 340—341
 - простого механизма Михаэлиса—Ментен 45—47
 - простых бимолекулярных реакций 45
 - разделения цепей 344
 - ренатурации ДНК 355—357
 - — — *E. coli* 350
 - сворачивания и разворачивания белков 221—225
 - — — — лизоцима А 222—223
 - циклизации ДНК фага λ 385
- Кинетические кривые, сигмоидные и гиперболические 87—88
- Кинетический анализ ренатурации ДНК 347—350
- — — — применение 355—358
- Кинетическое уравнение второго порядка для ренатурации двухцепочечных комплексов 347—348
- Кислород и процессы ионизации, оценка значений рК 111—112
- оценка микроскопических констант связывания 106
- Кислотно-основной катализ, обмен протонов в AU-парах 298
- Кислые формы двойных спиралей полинуклеотидов 275
- Кляйнишмидта метод и визуализация сверхспиральной ДНК 396
- — различие между одно- и двухцепочечными ДНК 383
- Кодон—антикодон, стабильность комплекса 423
- Кольцевые замкнутые ДНК 387
- — — седиментация 397
 - — — топологические свойства 387—389, 391—394
- Конденсация ДНК с полимерами 304
- противоионов на полиэлектролите 283—284
- Конкурентное связывание олигонуклеотидов 425
- Константа равновесия процесса денатурации белков кажущаяся 216—218
- — реакции образования димеров олигонуклеотидов 311
 - — — — комплексов белков с нуклеиновыми кислотами 361
 - — — — межмолекулярных комплексов олигонуклеотидов 316—317

- Константы связывания олигонуклеотидов с тРНК 422—426
- скорости ассоциации и диссоциации фермент-лигандных комплексов 70
- — и времена релаксации мономолекулярных переходов фермент-лигандных комплексов 71
- Конфигурационная статистическая сумма системы нуклеиновая кислота—лиганд 366
- Конформационная статистическая сумма 317
- энергии полипептидной цепи как целого 139
- — при расчете расстояния между концами цепи 125
- Конформационное равновесие в полипептидах 179—207
- Конформационные изменения в полипептидах 180
- — — тРНК 431—435
- переходы в белках 209—237
- Конформационный анализ одноцепочечных полинуклеотидов 168—170
- Конформация ДНК 171—172
- Кооперативное связывание, график Скэтчарда 363
- Кооперативность конформационных переходов в одноцепочечных олигонуклеотидах 261—262
- перехода спираль—клубок в полипептидах 185—188
- плавления ДНК 330
- связывания белков с нуклеиновыми кислотами 361
- — лигандов 364—369
- Кооперативные взаимодействия 17—18
- Кооперативный процесс образования мицелл 455
- — переход спираль—клубок 184
- Коэффициент седиментации ДНК, зависимость от молекулярной массы 171
- — зависимость от молекулярной массы для макромолекул разной формы 166
- — и коэффициент трения 165—166
- — компактных форм ДНК 304
- — сверхспиральной ДНК 397
- трения, зависимость от молекулярной массы для молекул разной формы 166
- — сплошной сферы 166
- — статистического клубка 166
- экстинкции, изменение при плавлении ДНК 281—282
- Кривая оксигенации, влияние ДФГ и CO_2 115—116
- — очищенного гемоглобина и целой крови 112
- — целой крови, связь с венозным и артериальным давлением 113
- Кривые смешивания 264—267
- Критическая концентрация лиганда на ДНК 397—398
- — — — и число свертывков 399—400
- Круговой дихроизм (спектры КД), влияние нуклеотидной последовательности 251
- — волокон нуклеиновых кислот 301—302
- — и предплавление ДНК 303
- — олигонуклеотидов 250—251
- — — и ориентация хромофоров 251
- — poly (A) и poly (C) 241—243
- — расчет для двухцепочечной ДНК 281
- — сравнение с данными ЯМР 258
- Кручение 392
- Кулона закон для среды без ионов 244
- Лайнуивера—Берка* график 50
- β -Лактоглобулин, денатурация в растворе мочевины 213
- спектры КД 183
- термодинамические параметры денатурации 214
- Латеральная диффузия в мембранах 468—470
- Лецитиновый бислой, уменьшение сигнала ПМР 480
- Лизоцим, кинетика разворачивания и сворачивания 222—223
- реокисление и ренатурация восстановленной формы 234—235

- ЯМР при денатурации 230—232
- Линеаризованные уравнения скорости ферментативных реакций 62—63
- Липиды спин-меченные 468—470, 473. *См. также* Амфифильные вещества; Бислои; Мицеллы
- «Липкие» концы ДНК фага λ 384
- LiCl как растворитель при низких температурах 259
- Магний, стабилизация структуры РНК 410, 429
- Макроскопические константы 6—8
- Максимальная скорость реакции 49. *См. также* Число оборотов
- — — и нижние пределы для констант скорости 52
- Манделькерн—Флори—Шераги коэффициент 167—168
- Матрица статистических весов, приведение к диагональному виду 198—199
- — — при расчете статистической суммы 197—199, 366—368
- — — собственные векторы и собственные числа 198—199, 368—369
- Матрицы преобразования при расчете внутрицепочечных расстояний в полипептидах 140—146
- — — произведение 141—143
- — — усредненные для глицина и L-аланина 146
- Матричная алгебра 484—487
- Межмолекулярная ассоциация и клизация ДНК 385
- Мембрана, поляризация и мембранный потенциал 453—454
- трансмембранная разность pH 452—453
- установление равновесия по разные стороны 444—454
- — — — — влияние заряженных макромолекул 450—452
- — — — — и $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насос 454
- — — — — перенос веществ 454. *См. также* Доннана эффект
- — — — — химический сдвиг 444—446
- Метилированные основания, спектры ЯМР 415—416
- Метод температурного скачка, изучение сворачивания и разворачивания рибонуклеазы 227—228
- — — tРНК 431—435
- — — определение времени образования и разрушения стэкинга 335
- «хозяин—гость» 204—206
- Миграция точек ветвления 358—359
- энергии в FeAD 334
- — синглетного возбуждения в tРНК 427
- Микроскопические константы 6—8
- Миоглобин, калориметрические данные 219
- кривые оксигенации 104
- термодинамические параметры денатурации 214
- энтальпия денатурации 219
- Михаэлиса константа 47
- — и нижние пределы констант скорости 52
- — связь с константами равновесия 51
- Михаэлиса—Ментен механизм 45—48
- — в случае многочисленных промежуточных форм фермента 47—48
- — — — — одной промежуточной формы фермента 46
- — — — — четырех промежуточных форм фермента 48
- — условие применимости принципа стационарных концентраций 46—47
- Мицеллы, образование 455, 457—458
- размеры и форма 458—459
- содержимое 456—457
- Модель двух состояний и кинетика денатурации белков 221—223
- — — — — образования олигонуклеотидной двойной спирали 336—337
- — — — — конформационное равновесие в динуклеотидах 259
- — — — — образование межмолекулярного комплекса 316
- — — — — определение термодина-

- мических параметров 211, 214
- — — недостатки 340
- — — применение к рибонуклеазе 211—212
- — — статистическая сумма 319
- «застежка-молния» и образование межмолекулярного олигонуклеотидного комплекса 316, 318—319
- — — переход спираль—клубок 193—196
- — — со сдвигом 317
- клеверного листа, противоречие с экспериментальными данными 408—409, 419—420
- — — спектры ЯМР 415
- *Моно—Уаймена—Шанжэ* (МУШ) 92—97
- — — экспериментальная проверка 99—102
- поворотнo-изомерная 136—138
- с исключением мест связывания 369—374
- Моно—Уаймена—Шанжэ* модель (МУШ) 92—97
- Мономолекулярные реакции 42—44
- Монослойный пузырек 471
- Mn^{II} , связывание с олигонуклеотидами 256
- Невозмущенное состояние, размеры цепи** 127—128
- Нитроксид, восстановление аскорбиновой кислотой 417
- Нитроксидный радикал 466
- — — и уширение линий спектров ЯМР 417
- Нитротирозин как спектральный маркер при исследовании АКТа-зы 100—101
- Нуклеация больших петель 327—330
- параметр нуклеации и стэкинг 261—262
- при переходе спираль—клубок в полипептидах 193, 196. *См. также* Инициация образования спирали в полипептидах
- спирали 326
- — — энтальпия 539—540
- спиральной области 317
- число участков нуклеации при ренатурации ДНК 352—354
- Нуклеотидная последовательность, влияние на взаимодействие с белками** 361
- — — — связывание с актиномицином D 378
- — — — — лигандами 370
- — — — — этидием 379
- — — — седиментационные свойства ДНК 324
- — — — спектры КД 251
- — — — стабильность двойной спирали 314
- — — — димерных комплексов 311
- — — — структуру ДНК 283
- — — — энергию образования пары оснований 324
- Нуклеотидный состав, влияние на плавучую плотность ДНК** 278—280
- — — — стабильность двойных спиралей модельных соединений 314
- — — — температуру плавления 278—280
- Обмен протонов, катализ щелочью** 294
- Одноцепочечные нуклеиновые кислоты, влияние соли на структуру** 243—245
- — — дисперсия оптического вращения 253
- — — спиральная структура 240—241
- — — полинуклеотиды, конформационный анализ 168—170
- Оксигемоглобин, сравнение с дезоксигемоглобином** 116—118
- Олигомеры как модели полимеров** 240
- комплементарные, спаривание 321
- самокомплементарные, самоассоциация 310
- — — статистическая сумма 320
- Олигонуклеотиды как модель двойной спирали** 308

- — — одноцепочечных полинуклеотидов 248—253
- образование двойной спирали 338
- — — доля спаренных оснований 320
- плавление, зависимость от концентрации 314
- стабильность двойной спирали, зависимость от длины 313
- Оптическое вращение, изменение при плавлении олигонуклеотидов 260
- Органические фосфаты, влияние на кривую оксигенации гемоглобина 112—114
- Осмотическое давление 446—449
 - — использование для определения молекулярной массы 449—450
- Отжиг ДНК 343
- Палиндромные последовательности, кинетика ренатурации 351
- Переход порядок—беспорядок в фосфолипидных бислоях 470—472
 - спираль—клубок в одноцепочечных полинуклеотидах 261—262
 - — — поли-L-глутаминовой кислоте 183—184
 - — — полипептидах 179—180, 201—204
 - — — механизм 185—188
 - — — — рост спирали 193
 - — — — ширина перехода 189, 200
 - — простое термодинамическое рассмотрение 188—190
 - — ранние исследования 185—188
- Перрена коэффициент при расчете коэффициентов трения и седиментации 166
- Персистентная длина 152—154
 - — в модели Порода—Кратки 174—175
 - — оценка значения для ДНК 172
- Петли в молекулах больших РНК 440
 - из неспаренных оснований 312
 - образование при нуклеации спирали 326—327
- свободная энергия 327
- слияние 330
- Плавление двойной спирали, гидродинамические исследования 276
 - двухцепочечных гомополимеров 267—268
 - динуклеозидфосфатов 258—260
 - ДНК, влияние ионной силы 282—283
 - — электронно-микроскопическое изучение 289
 - и изменение вязкости 276
 - — — спектров ЯМР 415—416, 435—436
 - одноцепочечных полинуклеотидов 245—246
 - природных ДНК, форма кривых плавления 287—288
 - тРНК 431—436
 - тРНК^{Met}_f 430
- Плавающая плотность ДНК, влияние нуклеотидного состава 278—280
 - — — и определение степени сверхспиральности 402—403
 - — природных и синтетических ДНК 280
- Плотность сверхвитков 399
 - — влияние на связывание с этидием 402
 - — природных ДНК 407—408
- Повторы, обнаружение по кинетике ренатурации 350
 - распределение в геноме 355—358
- Поглощение полинуклеотидов, изменение при плавлении 276
- Полиадениловая кислота [poly (A)], комплекс с poly (U) 265
 - — коэффициент седиментации 169
 - — протонированная форма 274
 - — радиус инерции 246
 - — расстояние между фосфатами 287
 - — спектры КД 241—242
- Поли-L-аланин, длина статистического сегмента 152
 - персистентная длина 153
 - размеры клубка 147—149
 - характеристическое отношение 147—149

- Поли- γ -бензил-L-глутаминовая кислота, переход спираль—клубок 203
- Полигидроксипропилглутамин в экспериментах типа «хозяин—гость» 205
- Полиглицин, длина статистического сегмента 152
- персистентная длина 153
- характеристическое отношение 147
- Поли-L-глутамин, переход спираль—клубок 183—185
- Полигуаниловая кислота [poly (G)] 263
- Полиинозиновая кислота [poly (I)], образование спирали 263—264
- Поли-L-лизин, спектры ДОВ 180
- α -спиральная структура 180, 182
- структурные превращения в растворе 179—180
- Поли-L-пролин, длина статистического сегмента 152
- конформационные формы 179, 181
- персистентная длина 153
- характеристическое отношение 147—149
- Полипептиды, виртуальные связи 138
- конформационные расчеты 147—151
- схематическое изображение 138
- Полиуридиловая кислота [poly (U)], комплекс с poly (A) 265—266
- коэффициент седиментации 169
- спектры КД 242
- спиральная структура 306
- среднее расстояние между фосфатами 287
- характеристическая вязкость 169
- Полицитидиловая кислота [poly (C)], дисперсия оптического вращения 253
- протонированная форма 274
- рентгеноструктурный анализ 249
- спектры КД 241, 243
- Полиэлектролиты, электростатическая свободная энергия 284
- Полиэтилен, длина статистического сегмента 152
- Полиэтиленгликоль, конденсация ДНК 304
- Поляризация мембраны 453—454
- Порода—Кратки* модель 172—176
- Порядок зацепления 391—392
- и сверхспирализация кольцевых замкнутых двухцепочечных молекул 389—390
- инвариантность 389
- определение 388
- Потенциальная функция вращения связей 136—137
- Предплавление ДНК, изменение вязкости 277
- спектров КД 303
- Преобразования подобия, приведение матрицы статистических весов к диагональному виду 198—199
- Пролин, характеристическое отношение для полимера 147—149
- *цис-транс*-изомеризация имидных связей в рибонуклеазе 229
- Промежуточные состояния 215—220
- Противоионы, высвобождение при плавлении ДНК 285
- связывание с полиэлектролитом 283—284
- Протомер 92
- Протоны, обмен в пурине 255
- тРНК 411—412, 418—421
- реакции переноса 293—295
- Профлавин 360
- Псорален, сшивки внутри молекулы тРНК 438—440
- Пурии, обмен водорода при C^8 в тРНК 418
- pH, влияние на свойства замкнутой двойной спирали ДНК 387
- скорость ферментативных реакций 53—58
- pK_a и кинетика обмена протона 294
- образование двойной спирали 275
- poly (A·U), зависимость плавления от ионной силы 287

- кинетика ренатурации 350
- кривая плавления 268
- тритиевый обмен 298
- фазовые диаграммы 270, 271
- poly [d(AT)·d(AT)], кривая плавления 276
- предплавление 303
- температура плавления 279
- тритиевый обмен 298

- Равновесный диализ 444—446**
 - — измерение констант связывания олигонуклеотидов с тРНК 421
- Радиальная функция распределения для свободно-сочлененной цепи 132—133**
- Радиус инерции 126—127**
 - — и средние размеры цепи 127—128
 - — poly (rA) 246
- Размеры молекулы полимера 160—178**
 - — — в рамках модели Порода—Кратки 175—176
- Райзинг 393**
- Раскручивание ДНК, кинетика 344—345**
 - — при интеркаляции 377—378, 404
 - — — связывании с РНК-полимеразой 407
 - — — — этидием 397—404
 - — щелочью 395
- Распределение Больцмана для сверхспиральных молекул ДНК 406—407**
 - — и расчет вероятности конформационного состояния 136—137
- Гаусса 129—132
- — и расчет энтропии замыкания петель 328—329
- — — реальные цепи 133—134
- расстояния между концами цепи 129—133
- спиральных участков полипептидов по длинам 195
- Реакции, контролируемые диффузией, бимолекулярная константа скорости 68—70**
 - — — в процессе спаривания оснований 335
- Рекомбинантные ДНК 386**
- Рекомбинация и миграция точек ветвления 359**
- Релаксационная спектроскопия 58—71**
 - — термодинамические основы 59—61
- Релаксированная ДНК 400**
 - — и действие топоизомеразы 406
 - — электрофорез 405
- Ренатурация ДНК 342**
 - — кинетика 350
 - — применение кинетического анализа 355—358
- Рентгеноструктурный анализ бислоев 462—464**
 - — волокон ДНК 301
 - — комплексов олигонуклеотидов с лигандами 374
- Репортерские группы и сворачивание рибонуклеазы 227—228**
- Репрессор, характеристики связывания с ДНК 361**
- Рестриктазы, фрагменты ДНК и кинетический анализ ренатурации 355**
- Решетка, связывание больших лигандов 31—38**
- Рибоза, влияние конформации на размер клубка полинуклеотида 170**
- Рибонуклеаза А 71—81**
 - — активный центр 78—81
 - — влияние субтилизина 74—75
 - — исследование с помощью репортерских групп 227—228
 - — кинетика ренатурации 228—229
 - — модель двух состояний 211—212
 - — химическая модификация 73—74
 - — *цис-транс*-изомеризация имидных связей 229
 - S 74
 - T₁ 419
- Рибосомные белки 361**
- РНК двухцепочечная, спектр КД 302**
 - предсказание структуры 330—332

- связывание с белками 361
- РНК-полимераза 361
- связывание с ДНК фага λ 407
- рРНК, вторичная структура 289—291
- Сателлитная ДНК, кинетика ренатурации 350—351
- Сахар, изменение конфигурации при интеркаляции 374, 379
- Сверхвитки и энергия сверхспирализации 400—401
- моделирование с помощью ленты 392—393
- плотность, изменение под действием ферментов 408
- схематическое изображение 390
- число 399—400
- — изменение при связывании красителя 399
- — связь с райзингом 393
- Сверхспирализация см. Сверхвитки
- Сверхспираль, знак 389, 394—395
- Свободная энергия взаимодействия в биологических системах 31
- — полиэлектролита 244, 284
- — сверхспирализации 401
- — связывания лигандов 27—31
- Свободно-протекаемый клубок 159—164
- — характеристическая вязкость 162—163, 165
- Свободно-сочлененная цепь 128—134
- — энтропия замыкания петель 328
- Связывание белков с нуклеиновыми кислотами 361
- лигандов на решетке и понятие условной вероятности 33
- — с ДНК 359—380
- — кристаллоподобными структурами 31—38
- — — макромолекулами, взаимодействие центров связывания 15—38
- — — — независимые центры связывания 8—15
- — — — случай двух различных лигандов 21—26
- — — — экспериментальная регистрация 362—364
- — — — энергетические аспекты 27—31
- — — — эффект Бора 27, 108—111
- — — полинуклеотидами 268, 284—286
- — — сверхспиральной ДНК 401
- олигонуклеотидов с тРНК 422—426
- Сефалекс 295
- Симметрия C_2 и комплексы ДНК-лиганд 374—377
- Системы координат для каждой связи в полимере 139—140
- — преобразование 143—146
- — — для виртуальных связей 146
- Скэтчарда* графики 12—16, 19—21, 34—38
- β -Слой в поли-L-лизине 182
- Соли, влияние на плавление ДНК 282
- — — систему poly (A) + poly (U) 271
- — — структуру одиночных цепей 243—245
- Сополимеры аланина и глицина 150
- самокомплементарные, спаривание оснований 263
- Спаривание оснований в трехцепочечных комплексах 267
- — — тРНК 411—412
- — и тритиевый обмен 296, 419—420
- — кинетика 297, 338—340
- — термодинамические параметры 324
- Спектры КД см. Круговой дихроизм
- Спиновые обменные взаимодействия в спин-меченном бислое 469—470
- — — — монослойных пузырьках 470—472
- метки, использование при анализе спектра ЯМР 417
- Спираль в полипептидах 185, 188—190, 200—203
- проекция на боковую поверхность цилиндра 392
- Сплошная сфера, коэффициент трения 166
- — характеристическая вязкость 164—165

- Среднеквадратичное расстояние между концами 124—126
- — — — в матричной форме 142—143
 - — — — модели виртуальных связей для полипептидов 139—146
 - — — — Порода—Кратки 175
 - — — — свободно-сочлененной цепи 128—129, 132—133
 - — — — цепи и радиус инерции 127—128
 - — — — со свободным вращением 134—135
 - — — — экспериментальные значения для полипептидов 148—150
- Стабильность спирали и температура плавления 272—274
- Статистическая механика и образование межмолекулярного олигонуклеотидного комплекса 316—320
- — — связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами 364—370
 - — матричные методы 366—368
 - сумма для модели «застежка-молния» 193—194
 - — — структур со шпилькой 321
 - — и конформационное равновесие 190—192
 - — — расчет параметров перехода спираль—клубок 194—195, 199—201
 - — — статистический вес 192
 - — матричные методы нахождения 196—201
 - — образование двухцепочечных комплексов 317, 319—320
 - — правила построения 192
 - — связывание лигандов 366—368
 - — связь с температурой плавления 322
- Статистический вес и статистическая сумма 192—194
- — матрица 197—199
 - — состояния 365
 - клубок, коэффициент трения 166
 - — оптические свойства 241
 - — — — — характеристическая вязкость 166—167
 - — — — — сегмент 151—152
 - — — — — для реальных цепей 152
- Стафилококковая нуклеаза и иммунологический метод исследования 235
- Стационарная кинетика ферментативных реакций 48—58
- — — — влияние pH 53—58
 - — — — соотношение Холдейна 51
- Степень спиральности полипептидов 194—196
- Стерические контакты между группами 138
- Стероид спин-меченный 470
- Стехиометрия комплексов, определение из кривых смешивания 264—266
- Стирлинга формула 130
- Стэкинг оснований в полинуклеотидах 242
- — — дезокси- и рибодинуклеотидах 256—258
 - — — влияние на оптическую активность 252
 - — — — спектр ЯМР олигонуклеотида 254
 - — — — тритиевый обмен 301
 - — — и гидродинамические свойства 246
 - — — кинетика образования 333—334
 - — — на конце олигомера 313
 - — — энтальпия 259
- Стэкинг-взаимодействие, влияние на спектр ЯМР tPHK 413
- — — способность олигонуклеотида образовывать комплексы 422
- Температура плавления 259—260
- — — влияние ионной силы 282—283
 - — — связывания с лигандами 270
 - — — длинных гомополимеров 325
 - — — для широкого перехода 260—261
 - — — ДНК, влияние нуклеотидного состава 278—280

- — зависимость от концентрации соли 271
- — и стабильность 272—274
- — как функция длины для олигонуклеотидных комплексов 313
- — олигонуклеотидных шпилек 315
- — олигорибонуклеотидных комплексов 312
- Термодинамические параметры переноса углеводов из воды внутрь додецилсульфатной мицеллы 456
- — — — в чистый жидкий углеводород 456
- — процесса денатурации белков 214
- — — — рибонуклеазы 211—213
- Тета-растворитель 155
- Тета-температура 155
- Тетраэтиламоний хлористый, влияние на плавление ДНК 279—280
- 4-тиоуридин, изучение плавления тРНК 430
- присоединение нитроксидного радикала 417
- сшивки в тРНК 430
- Топоизомеразы и репликация ДНК 347
- определение числа сверхвитков 404—406
- раскручивание ДНК 347
- свойства 407—408
- Топологические ограничения в кольцевой замкнутой двухцепочечной ДНК 387—389
- Топология кольцевых замкнутых двойных спиралей 391—394
- Тороидальные витки 390
- — порядок зацепления 394
- Трансмембранная разность pH 452—453
- Транспортная РНК см. тРНК
- Трение, влияние на плавление ДНК 346—347
- Третичная структура тРНК и спектры ЯМР 416—418
- — — при плавлении 436—437
- Трехцепочечные спирали, выявление 266—267
- — кривая плавления 268
- — перегруппировка цепей 271
- Тринуклеотиды, связывание с тРНК 422
- Тритиево-водородный обмен в модельных полинуклеотидных спиральных 297—298
- — — — — и наличие выступающих петель 306
- — — — нуклеиновых кислотах 300
- — — — пуринах 300
- — — — тРНК 418—421
- — как метод исследования 293—294
- — постановка эксперимента 295
- тРНК, гидродинамические свойства 410
- денатурированная форма 410
- жесткость молекулы 410
- изучение структуры с помощью образования внутримолекулярных сшивок 426
- кристаллическая структура и структура в растворе 419—420
- связывание с олигонуклеотидами 421—425
- спектры ЯМР 411—418
- стадии плавления 433
- структурная форма при низких ионных силах 432—433
- с флуоресцентной меткой, определение внутримолекулярных расстояний 427
- третичная структура 408—411
- тритиево-водородный обмен 300
- тРНК^{Met}, особенности структуры 429
- Фаг λ см. Бактериофаг λ
- Фазовые диаграммы для конформационных состояний полинуклеотидов 270—272
- — — системы poly (A) + poly (U) 271
- Фазовый переход в бислоях 470—472
- Ферменты, меняющие плотность сверхвитков 408
- Флавинадениндинуклеотид, кинетика образования внутримолекулярного стэкинга 332
- Флуоресценция и характерное время образования стэкинга 334—335

- тушение в FeAD 333
- Формальдегид, реакция с ДНК 292
- Формаимид как денатурирующий агент 292
- Фосфатидилхолин спин-меченный 468—469
- Фосфатная группа и спектр ЯМР нуклеотидов 256
- Фосфолипиды, изгибание внутри бислоя 472—474
 - латеральная диффузия в мембранах 468—470
 - перемещение между поверхностями бислоя 466—468
 - проникновение воды под поверхность бислоя 474—476
 - спин-меченные 468, 473
- Фрагментированная ДНК, кинетика ренатурации 348, 352—354
- Фторнитробензол и модификация рибонуклеазы 74
- Фурье-синтез электронной плотности поперек бислоя 462, 463
- Характеристическая вязкость ДНК, зависимость от молекулярной массы 171
 - клубка 162—163
 - — с неполной проницаемостью 164—165
 - макромолекул разной формы, зависимость от молекулярной массы 165
 - сплошных частиц 164
- Характеристическое отношение, асимптотическое значение 135—136
 - для апуриновой кислоты 170
 - — гомополипептидов 148
 - — полиуридиловой кислоты 170
 - — свободно-сочлененной цепи 128
 - — цепи со свободным вращением 135—136
 - предельное значение для различных полипептидов 147
 - — — сополимера L-аланина и глицина 150
 - связь с персистентной длиной 153
- Хилла коэффициент 18—21
- Химическая модификация, исследование третичной структуры тРНК 410—411
- Химический сдвиг и конформация рибозы в олигонуклеотидах 255
- Химотрипсिन, изменение энтропии при денатурации 219
 - термодинамические параметры денатурации 214
- Холдейна соотношение 51
- Холестерин, влияние на структуру двойных слоев 464—465
- «Холодная» денатурация белков 212—215
- Хроматография на гидроксипатите и ренатурация ДНК 355—356
 - при изучении тритиевого обмена 295
- Хугстеновские пары, пики резонансного поглощения 413
- Цепь полимерная, влияние длины на переход спираль—клубок 201—203
 - внутримолекулярная концентрация концов 386
 - — расстояние между концами 124—125
 - со свободным вращением 134—136
- Циклизация ДНК бактериофага λ 384
 - кинетика 385
 - конкуренция с димеризацией 386
- Цитохром c, кинетика сворачивания и разворачивания 223
 - — спиральные области 205—206
- Частичная денатурация белков 215—218
- Червеобразная цепь и модель Порода—Кратки 173—175
 - — как модель ДНК 175—176
- Число витков в замкнутой кольцевой молекуле 388
 - — — — — изменение при связывании с лигандом 398
 - оборотов 53

Ширина линий в спектре ЭПР
469—472

Шпильки 309

— в больших РНК 440

— — рРНК 290—291

— влияние на кинетику ренатурации
ДНК 342—343

— и межмолекулярные комплексы
314—315

— кинетика образования 340—341

— нуклеация 325—326

— образование при плавлении 277

— стабильность в зависимости от
размера 315

— учет при расчете статистической
суммы 321

— энергия образования 327

Щелочь, действие на замкнутую
кольцевую форму ДНК 387

Эдера схема 105—106

Экзонуклеаза III 288

Экситонное расщепление полос в
УФ-спектре полинуклеотидов 242

Электронная микроскопия сверхспи-
ральной ДНК 396—397

— — частично денатурированной
ДНК 289, 292

— — РНК 291

— плотность, распределение в леги-
тиновом бислое 463

Электронный парамагнитный резо-
нанс см. ЭПР

Электростатические эффекты, влия-
ние на вязкость клубка 277

— — — — перегруппировку цепей
272

— — — — структуру нуклеиновых
кислот 244—245

— — в полиэлектролитах 283—284

Электрофорез ДНК в геле 405

Энергия активации конформацион-
ных изменений тРНК 432

— — образования олигонуклеотид-
ных комплексов 338

— — — — зависимость от длины
цепи 340

— взаимодействия центров связыва-

ния кислорода в гемоглобине 18,
107—108

— как функция угла поворота вокруг
центральной связи 136—137

— образования петель 327

Энтальпия денатурации белков, ка-
жущиеся значения 218—219

— — — калориметрические измере-
ния 218—220

— — лизоцима 219

— — миоглобина 219

— — рибонуклеазы 219

— — химотрипсिनогена 219

— нуклеации спирали 326

— образования двойной спирали 325

— — зародышей спирали 339

— — колец ДНК фага λ 384

— реакции замещения цепей в спира-
ли 272—273

— связывания лигандов с полинукле-
отидами 269

— стэкинга 259

Энтропия нуклеации больших петель
327—330

— — спирали 326

— образования α -спирали 186—187

— циклизации ДНК 384—385

ЭПР, структура и функции бислоя
466—476

Этанол, влияние на структуру ДНК
302

— и компактные формы ДНК 304

Этенаденозин 334

Этидий 360

— взаимодействие со сверхспираль-
ной ДНК 399—403

— комплекс с динуклеотидами 379

— кривая связывания с ДНК 370

— кристаллическая структура ком-
плекса с 5-нод-УрА 372, 374

— связывание с тРНК 429

Якобсона—Штокмайера соотноше-
ние для энтропии петли 329

ЯМР динуклеозидфосфатов 254—255

— изменение спектров при денатура-
ции белков 230—235

— — — — спаривании оснований
310
— на ядрах ^{13}C бислая 476—478
— рибо- и дезоксирибодимеров
256—258
— тРНК и ее фрагментов 409

— — идентификация линий в спек-
тре 412—418
— — кинетика денатурации 434
— — спаривания оснований 411—412
— сдвиг линий, обусловленный
кольцевыми токами 255—256, 414

Список используемых в книге обозначений

В этот список включены наиболее часто используемые в данной книге обозначения. Нередко такие же символы применяются для обозначения других величин; их смысл поясняется в тексте.

A	Оптическая плотность
a	Константа сверхтонкого расщепления. Длинная полуось эллипса. Персистентная длина
$\mathbf{a}$	Базисный вектор элементарной ячейки
$\mathbf{a}^*$	Базисный вектор элементарной ячейки обратной решетки
b	Короткая полуось эллипса
$\mathbf{b}$	Базисный вектор элементарной ячейки
$\mathbf{b}^*$	Базисный вектор элементарной ячейки обратной решетки
C	Молярная концентрация
C_n	Ось симметрии n -го порядка. Характеристическое отношение
ΔC_P^0	Изменение стандартной теплоемкости при постоянном давлении
c	Скорость света в вакууме. Весовая концентрация
$\hat{c}_i$	Весовая концентрация i -го компонента
$\mathbf{c}$	Базисный вектор элементарной ячейки
$\mathbf{c}^*$	Базисный вектор элементарной ячейки обратной решетки
D	Коэффициент диффузии
$D_{\text{вр}}$	Коэффициент вращательной диффузии
$D_{20, \text{w}}$	Коэффициент диффузии, экстраполированный к условиям «20 °С, вода»
E_a	Энергия активации
E_d	Энергия взаимодействия двух диполей
E	Напряженность электрического поля
e	Заряд электрона
F	Отношения коэффициента трения эллипсоида к коэффициенту трения сферы того же объема. Фактор формы
$F(\mathbf{S})$	Структурный фактор
$F_{\text{H}}(\mathbf{S})$	Вклад в структурный фактор, вносимый тяжелым атомом
$F_{\text{сумм}}(\mathbf{S})$	Структурный фактор для ряда атомов
$F_{\text{м}}(\mathbf{S})$	Молекулярный структурный фактор

F	Сила
$\mathcal{F}$	Число Фарадея
f	Коэффициент трения поступательного движения
$f_{\min}$	Коэффициент трения поступательного движения дегидратированной сферы
$f_{\text{вр}}$	Коэффициент трения вращательного движения для сферы (вращательный коэффициент трения)
$f_{\text{сф}}$	Коэффициент трения поступательного движения для сферы
f_a, f_b	Коэффициенты трения вращательного движения эллипсоида вокруг осей a и b
G	Свободная энергия Гиббса
ΔG^0	Изменение стандартной свободной энергии Гиббса
ΔG_{ij}	Свободная энергия взаимодействия между двумя лигандами
$\Delta G_{\text{ост}}$	ΔG на один остаток
$\Delta G_{\text{полн}}$	Полная свободная энергия на 1 моль
$\Delta G_{\text{эл}}$	Изменение электростатической свободной энергии
$\Delta \Delta G_{\text{полн}}$	Разность между $\Delta G_{\text{полн}}$ двух конфигураций
g	g -фактор свободного электрона
$g_{\text{я}}$	Ядерный g -фактор
H	Энтальпия
H_{xy}	Проекция магнитного поля на плоскость xy
ΔH	Изменение энтальпии на 1 моль
ΔH^0	Изменение стандартной энтальпии на 1 моль
$\Delta H_{\text{ост}}$	ΔH на один остаток
ΔH_D	Изменение энтальпии при переходе от полностью нативного к полностью денатурированному состоянию
$\Delta H_{\text{каж}}$	Кажущееся изменение энтальпии для перехода от полностью нативного к полностью денатурированному состоянию
H	Напряженность магнитного поля
$H_{\text{рез}}$	Напряженность магнитного поля, при которой наблюдается резонансное поглощение
$\underline{H}$	Гамильтониан
$\hbar$	Постоянная Планка
$\hbar$	$\hbar/2\pi$
I	Интенсивность излучения. Спиновое квантовое число ядра. Ионная сила
$I(\text{S})$	Интенсивность рассеяния
i	$\sqrt{-1}$
$\hat{i}$	Единичный вектор в декартовой системе координат
J	Константа расщепления
$\mathbf{J}$	Поток вещества
$\hat{j}$	Единичный вектор в декартовой системе координат
K_D	Истинная константа равновесия для перехода из полностью нативного в полностью денатурированное состояние

K_P	Константа Михаэлиса для продукта
K_S	Константа Михаэлиса для субстрата
K_η	Коэффициент, связывающий вязкость с длиной цепи
K_s	Коэффициент, связывающий седиментацию с длиной цепи
$K_{\text{каж}}$	Кажущаяся константа равновесия для перехода от полностью нативного к полностью денатурированному состоянию
K_i	Макроскопическая константа равновесия. Константа равновесия для образования i -й конфигурации. Константа равновесия для перехода из нативного состояния в промежуточное i -е состояние
$\tilde{K}_i$	Кажущаяся константа диссоциации систем с одним лигандом
$\tilde{K}_{ij}$	Кажущаяся константа диссоциации систем с двумя лигандами
k	Константа Больцмана
k_T	Микроскопическая константа диссоциации для Т-состояния
k_R	Микроскопическая константа диссоциации для R-состояния
k_i	Микроскопическая константа равновесия
$\mathbf{k}$	Единичный вектор в декартовой системе координат
L_k	Контурная длина
L, L'	Константа равновесия для превращения $R_0 \rightleftharpoons T_0$
$\mathbf{L}$	Момент количества движения
l	Длина связи (в полимере)
l_z	Длина статистического сегмента
M	Молекулярная масса
$\bar{M}_n$	Среднечисленная молекулярная масса
$\bar{M}_w$	Средневесовая молекулярная масса
$\mathbf{M}$	Намагниченность
$\mathbf{M}_{xy}$	Проекция намагниченности на плоскость xy
$\mathbf{M}$	Матрица статистических весов
m	Масса объекта
m_e	Масса электрона
m_i	Моляльность i -го компонента
m_S	Магнитное спиновое квантовое число электрона
m_I	Магнитное спиновое квантовое число ядра
m'	Суммарная моляльность
$\hat{m}$	Оператор магнитного дипольного момента
N_0	Число Авогадро
P	Шаг спирали. Давление. Функция Паттерсона
P_r	Аксиальное отношение
pK_a	$-\lg K_a$
pO_2	Парциальное давление кислорода
$\hat{p}$	Оператор импульса
R	Газовая постоянная
R_G	Радиус инерции

$\langle R_G^2 \rangle_0$	Средний квадрат радиуса инерции для невозмущенной цепи
$\bar{R}$	Доля молекул в состоянии R
$\mathbf{R}$	Оператор пространственных координат ядра
r	Расстояние
r_D	Доннановское отношение
r_3	Радиус эквивалентной сферы
$\langle r^2 \rangle_0$	Средний квадрат расстояния между концами невозмущенной цепи
$\mathbf{r}$	Вектор, соединяющий концы полимерной цепи
$\mathbf{r}$	Оператор пространственных координат электрона
S	Сведберг (единица измерения коэффициента седиментации)
S_A	Парциальная молярная энтропия
S'_A	Аддитивный энтропийный вклад
$\Delta S_{\text{ост}}$	ΔS на остаток
ΔS^0	Изменение стандартной энтропии
ΔS_u^0	Изменение аддитивного вклада в энтропию
$\mathbf{S}$	Вектор рассеяния
s	Коэффициент седиментации. Статистический вес. Константа равновесия для процесса образования нового спирального остатка на конце спиральной последовательности
$s_{20, w}$	Коэффициент седиментации, приведенный к условиям «20 °C, вода»
$\hat{\mathbf{S}}$	Единичный вектор в направлении рассеяния излучения
$\hat{\mathbf{S}}_0$	Единичный вектор в направлении падающих лучей
T	Температура (обычно в градусах Кельвина). Доля молекул в состоянии T. Кручение
T_m	Температура плавления
T_1	Время продольной релаксации
T_2	Время поперечной релаксации
$\mathbf{T}$	Матрица преобразования
t	Время
u	Электрофоретическая подвижность
V	Объем
$V_{\text{гидр}}$	Объем гидратированной молекулы
V_i	Парциальный удельный объем i -го компонента
V_p	Максимальная скорость обратной реакции
V_s	Максимальная скорость прямой реакции
v	Скорость
$\bar{v}$	Парциальный молярный объем
v	Скорость
W	Райзинг
$W(r)$	Радиальная функция распределения расстояния между концами цепи
(X_i)	Равновесная концентрация
$\Delta(X_i)$	Разность между текущей и равновесной концентрациями

y	Степень насыщения центров (мест) связывания
z	Заряд макромолекулы или иона в единицах e
α	Степень ассоциации. Порядок зацепления
α_H	Коэффициент Хилла
β	Числа витков вторичной структуры
β_e	Магнетон Бора
β_n	Ядерный магнетон
β_s	Коэффициент Манделькерна—Флори—Шераги
β'	Коэффициент Шераги—Манделькерна
γ	Гиромангнитное отношение. Градиент скорости
δ	Химический сдвиг. Фазовый сдвиг
$\delta(x)$	Дельта-функция Дирака
δ_1	Степень гидратации (г/г)
ε	Диэлектрическая постоянная. Коэффициент молярной экстинкции
$\Delta\varepsilon$	Круговой дихроизм ($\varepsilon_L - \varepsilon_R$)
η	Вязкость раствора
η_0	Вязкость чистого растворителя
$\eta_{отн}$	Относительная вязкость
$\eta_{уд}$	Удельная вязкость
$[\eta]$	Характеристическая вязкость
θ_i	Степень насыщения центров i лигандами
θ	Угол рассеяния. Степень спиральности
$[\theta]$	Молярная эллиптичность
λ	Собственное число. Длина волны
μ	Химический потенциал 1 моля вещества
μ^0	Стандартный химический потенциал 1 моля вещества
$\hat{\mu}$	Химический потенциал 1 г вещества
$\hat{\mu}^0$	Стандартный химический потенциал 1 г вещества
μ_m	Магнитный момент
$\underline{\mu}$	Оператор электрического дипольного момента
ν	Частота. Коэффициент Симхи. Число молей лиганда, связанного с мо- лем макромолекул
$\bar{\nu}$	Средняя доля занятых мест связывания (степень связывания)
π	Осмотическое давление
ρ	Плотность в г/см ³
$\rho(r)$	Электронная плотность
σ	Сечение поглощения. Константа нуклеации
τ_F	Время затухания флуоресценции
τ_a, τ_b	Время релаксации вращения эллипсоида вокруг осей a и b
τ_c	Время вращательной корреляции
τ_r	Время релаксации вращения
Φ	Электростатический потенциал. Разность потенциалов

$\Phi_{\text{кл}}$	Универсальная постоянная для случайного клубка, $2,1 \cdot 10^{23}$
Φ_m	Мембранный потенциал
ϕ	Торсионный угол для связей N—C. Фаза структурного фактора
ϕ_{1a}, ϕ_{20} и т.д.	Волновые функции мономеров
ϕ_f	Квантовый выход флуоресценции
ϕ_p	Эффективный осмотический коэффициент
ϕ', ϕ''	Углы вращения остова молекул нуклеиновых кислот
$[\phi]$	Молярное вращение
χ_{GC}	Молярная доля GC-пар
χ	Торсионный угол для гликозидной связи
ψ	Торсионный угол для связи C'—C
ψ', ψ''	Углы вращения остова нуклеиновой кислоты
Ω_k	Число способов, которым можно образовать единую спиральную последовательность из k элементов в цепи из n звеньев
$\Omega_{n,i}$	Число способов, которым можно разместить i лигандов по n местам
связывания	
ω	Угловая частота или угловая скорость
ω_0	Ларморова частота
ω', ω	Углы вращения остова молекулы нуклеиновой кислоты
$\Delta\omega_{1/2}$	Ширина линии
ω	Угловая скорость

Оглавление

ТОМ 3

ПОВЕДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Глава 15. Взаимодействие макромолекул с лигандами в условиях равновесия. Перевод Н. П. Сугробовой	6
15.1. Важность взаимодействия макромолекул с лигандами	6
15.2. Равновесное связывание лигандов с макромолекулами	6
Макроскопические и микроскопические константы	8
15.3. Идентичные и независимые центры связывания	8
Расчет числа микроскопических форм	8
Расчет величины ν	9
Простой вывод	11
График Скэтчарда	12
15.4. Несколько типов независимых центров связывания	12
Нелинейные графики Скэтчарда	12
Анализ графика Скэтчарда, состоящего из двух участков	13
15.5. Взаимодействие между центрами связывания	15
Некоторые общие соображения	15
Распространенность кооперативных взаимодействий	17
Статистические эффекты и энергия взаимодействия	17
Полуэмпирический подход: коэффициент Хилла	18
15.6. Связывание двух различных лигандов: уравнения, описывающие взаимное влияние лигандов на их связывание	21
Формальная математическая трактовка	21
Два лиганда и основное соотношение, описывающее их взаимозависимое связывание	22
Другое уравнение, описывающее взаимозависимое связывание лигандов	23
Дополнительное уравнение	26
15.7. Энергетические аспекты взаимозависимого связывания лигандов	27
Свободная энергия взаимодействия	27
Влияние энергии взаимодействия на распределение связанных лигандов	29
Величины свободной энергии взаимодействия, обнаруженные в биологических системах	31

15.8. Взаимодействие больших лигандов с кристаллоподобными структурами	31
Однородная кристаллическая решетка: статистические особенности	32
Расчет характеристик связывания лигандов	33
Нелинейные графики Скэтчарда как следствие статистических эффектов	34
Некоторые результаты, полученные на реальных системах	35
Решетки ограниченной длины и концевые эффекты	36
Взаимодействие между лигандами	36
Краткие выводы	38
Задачи	38
Литература	39
<i>Глава 16. Кинетика взаимодействия лигандов с макромолекулами. Перевод Н. П. Сугробовой</i>	41
16.1. Исследование кинетики биохимических процессов	41
16.2. Мономолекулярные реакции	42
Одностадийные реакции	42
Две последовательные реакции	42
Ряд последовательных реакций	44
16.3. Простые бимолекулярные реакции	45
16.4. Простой механизм Михаэлиса — Ментен	45
Решение уравнения скорости для частного случая	45
Условия применимости принципа стационарности	46
16.5. Многочисленные промежуточные формы фермента	47
16.6. Стационарная кинетика	48
Механизм реакции с одним субстратом, одним продуктом и одной промежуточной формой фермента	48
Определение стационарных параметров ферментативных реакций из экспериментальных данных	50
Более общее решение: соотношение Холдейна	51
Связь между константами Михаэлиса и константами равновесия	51
Уравнение стационарной скорости в случае механизма с несколькими промежуточными формами фермента	51
Нижние пределы для констант скорости	52
Число оборотов	53
Влияние pH на скорость ферментативных реакций	53
Интерпретация pH-зависимостей	56
Определение констант ионизации	57
Ограничения стационарной кинетики	58
16.7. Релаксационная спектроскопия	58
Термодинамические основы релаксации	59
Кинетика релаксации	61
Линеаризованные уравнения скорости для двухстадийного механизма ферментативных реакций	62
Упрощенное выражение для времен релаксации в случае двухстадийного механизма	63
Другой вывод уравнений для времен релаксации в случае двухстадийного механизма	64

Набор времен релаксации в случае механизма с n промежуточными формами фермента	65
Некоторые выводы из исследований кинетики быстрых реакций	68
16.8. Рибонуклеаза как пример ферментативной системы	71
Вывод об образовании промежуточных соединений в ходе катализа на основании кинетических исследований	72
Метод химической модификации	73
Влияние субтилизина на рибонуклеазу	74
Активные димеры рибонуклеазы	75
Четыре остатка гистидина, идентифицированные методом ЯМР	76
Структура рибонуклеазы по данным рентгеноструктурного анализа	78
Краткие выводы	81
Задачи	82
Литература	84
Глава 17. Регуляция биологической активности. Перевод Ю. А. Шаронова	86
17.1. Биологическая регуляция	86
Ингибирование по типу обратной связи	86
Метаболизм пиримидина и аспартат-карбамоилтрансфераза	87
Аллостерические белки	87
17.2. Некоторые особенности и свойства аллостерических ферментов	87
Сигмоидные кривые	87
Влияние аллостерического ингибитора	88
Влияние конкурентного ингибитора	90
17.3. Модель Моно — Уаймена — Шанжё (МУШ) для аллостерических ферментов	91
Четыре основных допущения	92
Гомотропные и гетеротропные взаимодействия	92
Алгебраическое описание модели МУШ	92
Свойства y_F : влияние параметров L и c	95
Сравнение параметров R и y_F	97
Влияние аллостерических активаторов и ингибиторов	97
17.4. Экспериментальная проверка модели МУШ	99
Объяснение некоторых данных по взаимодействию лигандов	99
Соотношение между конформационными изменениями и относительным насыщением	99
17.5. Альтернативные модели для аллостерических белков	102
Последовательная модель	102
Более общая схема	104
17.6. Гемоглобин	104
Кооперативное связывание кислорода	105
Анализ равновесия связывания кислорода: схема Элера	105
Оценки микроскопических констант связывания кислорода	106
Концентрации промежуточных форм гемоглобина в процессе оксигенации	106
Константа Хилла и энергия взаимодействия гем—гем	107
Эффект Бора	108
Оценка значений pK для зависящих от кислорода процессов ионизации	111

Влияние органических фосфатов на кривую оксигенации	112
17.7. Взаимодействие двуокиси углерода с гемоглобином	114
17.8. Связь между структурой и механизмом функционирования гемоглобина	116
Краткие выводы	119
Задачи	120
Литература	122
Глава 18. Конфигурационная статистика полимерных цепей. Перевод <i>А. В. Вологодского</i>	123
18.1. Усреднение по конформациям	123
18.2. Определение параметров, зависящих от конформации	124
Расстояние между концами цепи и радиус инерции	124
Средние размеры цепи в невозмущенном состоянии	127
18.3. Свободно-сочлененная цепь	128
Аналогия между свободно-сочлененной цепью и траекторией диффундирующих молекул газа	128
Характеристическое отношение	129
Распределение расстояний между концами цепи	129
Два вида функции распределения	132
Гауссова функция распределения и реальные цепи	133
18.4. Цепь со свободным вращением	134
Вычисление $\langle r^2 \rangle_0$	134
Поведение характеристического отношения	135
18.5. Реальные цепи и поворотнo-изомерная модель	136
18.6. Вычисление внутрицепочечных расстояний в полипептидах	138
Вычисление $\langle r^2 \rangle_0$ в модели виртуальных связей	139
Система координат для каждой связи	139
Преобразование матриц	140
Произведение усредненных матриц преобразования	141
Суммирование произведения матриц	142
18.7. Нахождение матрицы преобразования координат	143
Преобразование между системами координат для виртуальных связей	146
Усреднение матрицы преобразования для глицина и L-аланина	146
18.8. Результаты конформационных расчетов параметров полипептидов ...	147
Диполь-дипольное взаимодействие между амидными группами	147
Различие между полимерами, состоящими из остатков глицина, L-аланина и L-пролина	148
Сравнение расчетных и экспериментальных данных	150
Сополимеры полипептидов	150
18.9. Статистический сегмент	151
Связь между статистическим сегментом и реальными связями	151
Размеры статистических сегментов для реальных цепей	152

18.10. Персистентная длина	152
18.11. Эффект исключенного объема и невозмущенное состояние	154
Качественное рассмотрение влияния эффекта исключенного объема на размеры цепи	154
Тета-растворители и тета-температура	155
Краткие выводы	155
Задачи	156
Литература	157
<i>Глава 19. Основы гидродинамики полимерной цепи и размеры молекулы полимера. Перевод Ю. А. Банникова</i>	<i>159</i>
19.1. Гидродинамика полимерной цепи	160
19.2. Свободно-протекаемый клубок	160
Вращательное движение клубков в ламинарном потоке	160
Угловая скорость вращения полимерной молекулы в градиенте скорости	161
Характеристическая вязкость свободно-протекаемого клубка	162
Недостатки свободно-протекаемой модели	163
19.3. Характеристическая вязкость клубков, для которых условие свободного протекания не выполняется	164
19.4. Коэффициент трения и коэффициент седиментации	165
Коэффициент трения и характеристическая вязкость	166
Коэффициент Манделькерн — Флори — Шераги	167
19.5. Анализ конформации одноцепочечных полинуклеотидов	168
19.6. Конформация ДНК	171
19.7. Модель для случая жестких цепей: цепь Порода — Кратки	172
Модель Порода — Кратки	173
Связь между длиной и размерами червеобразной цепи	175
Приложение модели Порода — Кратки к ДНК	175
Краткие выводы	176
Задачи	176
Литература	177
<i>Глава 20. Конформационное равновесие в полипептидах и белках: переход спираль — клубок. Перевод Л. А. Белорусского</i>	<i>179</i>
20.1. Конформационная стабильность и конформационные изменения	179
20.2. Переход спираль — клубок: ранние исследования	183
20.3. Молекулярный механизм перехода	185
20.4. Простое термодинамическое рассмотрение перехода	188
20.5. Использование статистических сумм для анализа конформационного равновесия простых линейных цепей	190
Статистические веса	192
Правила построения статистической суммы	192

20.6. Модель типа «застежка-молния» для перехода спираль — клубок	193
Выбор статистических весов	193
Построение и расчет статистической суммы	193
Степень спиральности и вероятности	194
20.7. Матричный метод нахождения статистической суммы	196
Нахождение матрицы статистических весов	197
Расчет статистической суммы с помощью матрицы статистических весов	197
Приведение матрицы статистических весов к диагональному виду	198
Расчеты параметров с помощью статистической суммы	199
20.8. Описание перехода спираль — клубок	201
20.9. Сравнение с экспериментальными данными	203
20.10. Параметры, характеризующие способность аминокислот встраиваться в спираль	204
Краткие выводы	206
Задачи	207
Литература	208
<i>Глава 21. Конформационное равновесие в полипептидах и белках: обратимое сворачивание белков. Перевод Л. А. Белорусского</i>	<i>209</i>
21.1. Конформационные переходы в белках	209
21.2. Температурный диапазон, в котором происходит равновесное сворачивание — разворачивание	210
21.3. Нахождение термодинамических параметров: простая модель двух состояний	211
Применение модели двух состояний к рибонуклеазе	211
Предсказание «холодной» денатурации	212
21.4. Поиски промежуточных состояний: равновесные исследования	215
Частичная денатурация и изменение физических свойств	215
Калориметрический тест на существование промежуточных состояний	218
21.5. Кинетические исследования процесса сворачивания белков	220
Кинетика в случае модели двух состояний	221
Кинетика в случае модели трех состояний	223
Использование амплитудных параметров для разграничения механизмов	226
21.6. Репортерские группы (зонды)	226
Исследование рибонуклеазы с помощью репортерских групп	227
21.7. Интерпретация двухфазных кинетических кривых денатурации	228
21.8. Исследования методом ЯМР	229
ЯМР лизоцима в области перехода	230
ЯМР гистидиновых остатков рибонуклеазы при pH 1,3	232
21.9. Состояние исследований по сворачиванию белковых молекул	234
Краткие выводы	236

Задачи	236
Литература	238
Глава 22. Структурные переходы в нуклеиновых кислотах. Перевод А. В. Вологодского	239
22.1. Исследования нуклеиновых кислот	239
Сравнение с исследованиями белков	239
22.2. Структура и стабильность одноцепочечных нуклеиновых кислот	240
Доказательство упорядоченности структур гомополинуклеотидов	241
Влияние соли на локальную структуру одиночных цепей	243
Влияние температуры на свойства гомополимеров	245
Спираль с одноцепочечным стэкингом	246
Олигонуклеотиды как модель одноцепочечных полинуклеотидов	248
Сравнение оптических свойств олиго- и полинуклеотидов	250
Исследования структур с межплоскостным взаимодействием методом ЯМР	254
Исследования рибо- и дезокси-димеров методом ЯМР	256
Конформационное равновесие в динуклеотидах	258
Стэкинг-равновесие как функция длины цепи	261
22.3. Равновесие между одно- и двухцепочечными структурами	262
Синтетические двухцепочечные полинуклеотиды как модельные системы	262
Определение стехиометрии комплексов по кривой смешивания	264
Доказательство образования двух- и трехцепочечных структур с помощью кривых смешивания	266
Устойчивость гомополимерных комплексов к повышению температуры	267
Фазовые диаграммы для конформационных состояний полинуклеотидов	270
Температура плавления и стабильность	272
Влияние pH на структуру полинуклеотидов	274
Гидродинамические исследования плавления двойной спирали	276
Зависимость свойств двухцепочечной ДНК от нуклеотидного состава	278
Влияние нуклеотидного состава на температуру плавления ДНК и ее плавучая плотность	278
Влияние последовательности оснований на свойства двойной спирали	281
Влияние ионной силы на термостабильность двойной спирали	282
Термодинамика линейных полиэлектролитов	283
Влияние ионной силы на плавление полинуклеотидов	284
Применения теории полиэлектролитов	286
Форма кривых плавления природных ДНК	287
22.4. Флуктуации и изменения структуры двойной спирали	293
Скорость третичного обмена экспонированных протонов	293
Третичный обмен в основаниях двухцепочечных нуклеиновых кислот	295
Динамика двойной спирали ДНК	297
Прямое изучение обмена отдельных протонов	300
Изменение типа вторичной структуры	301
Предплавление ДНК	303
Компактные формы ДНК	303
Краткие выводы	305
Задачи	306
Литература	307

Глава 23. Статистическая механика и кинетика взаимодействий в нуклеиновых кислотах. Перевод А. В. Вологодского	308
23.1. Статистическая термодинамика образования двойной спирали	308
Исследования коротких олигонуклеотидных двойных спиралей методом ЯМР	308
Исследование более длинных олигонуклеотидных двойных спиралей оптическими методами	311
Модели образования межмолекулярного комплекса	316
Анализ экспериментальных данных: самокомплементарные олигомеры	319
Анализ экспериментальных данных: образование комплементарных комплексов и шпилек	321
Расчет свободной энергии отдельных взаимодействий в спирали	322
Определение энтальпии взаимодействия в олигонуклеотидах	323
Нуклеация спирали; образование петель и шпилек	326
Вычисление энтропии нуклеации для больших петель	327
Предсказание структуры РНК	330
23.2. Кинетика конформационных изменений	332
Стэкинг-взаимодействия отдельных оснований	332
Спаривание изолированных оснований	335
Образование олигонуклеотидных комплексов: экспериментальные данные	336
Анализ кинетики спаривания оснований в олигонуклеотидах	338
Образование шпилек	340
Плавление ДНК	341
Плавление ДНК до разделения цепей	343
Влияние трения на плавление ДНК	346
Ренатурация комплементарных цепей	347
Размер генома и повторяющиеся последовательности	349
Смысл константы скорости ренатурации	352
Методы разделения	354
Применения кинетического анализа ренатурации	355
Миграция точек ветвления	358
23.3. Связывание нуклеиновых кислот с молекулами меньшего размера	359
Экспериментальная регистрация связывания лигандов	362
Описание взаимодействия между соседними местами связывания или соседними лигандами статистическими методами	364
Матричный метод вычисления статистической суммы	366
Вычисление кривых связывания	368
Модель с исключением мест связывания при интеркаляции	369
Кристаллы комплексов олигонуклеотидов с этидием	376
Комплекс между актиномицином D и дезоксигуанозином	377
Исследования комплексов олигонуклеотидов с интеркалирующими лигандами в растворе	378
Краткие выводы	380
Задачи	381
Литература	382
Глава 24. Третичная структура нуклеиновых кислот. Перевод Ю. А. Банникова	383
24.1. Кольцевая ДНК	383
Линейная и кольцевая формы ДНК фага λ	383
Топологические ограничения в кольцевой замкнутой двухцепочечной ДНК	387

Сверхспирализация в кольцевых замкнутых двухцепочечных молекулах	389
Наблюдение сверхспирализации на опыте	395
Связывание с красителями как способ определения числа сверхвитков	399
Энергия сверхспирализации	400
Определение степени связывания красителя по величине сдвига плавучей плотности	402
Определение числа сверхвитков	404
Топоизомеразы	407
24.2. Третичная структура РНК	408
Доказательства существования третичной структуры у тРНК в растворе	408
Измерения доли спаренных оснований в тРНК в растворе	411
Установление соответствия между линиями в спектрах ЯМР тРНК и конкретными парами оснований	412
Третичная структура тРНК и спектры ЯМР	416
Медленно протекающий тритиево-водородный обмен	418
Образование комплексов с олигонуклеотидами	421
Результаты, полученные при изучении связывания олигонуклеотидов с тРНК ..	422
Образование шпиков и миграция энергии	426
Диаграмма состояний для конформаций тРНК	429
Кинетические исследования конформационных изменений в тРНК	431
Использование метода ЯМР для установления соответствия между наблюдаемыми релаксационными процессами и структурными участками в тРНК	435
Различные стадии плавления тРНК	436
Вторичная и третичная структуры больших РНК	437
Краткие выводы	440
Задачи	441
Литература	443
Глава 25. Введение в теорию установления равновесия по разные стороны мембран; структура двойных слоев. Перевод А. А. Полежаева	444
25.1. Мембранные системы	444
25.2. Установление равновесия по разные стороны мембраны	444
Общие соображения	444
Трансмембранное осмотическое давление	446
Использование осмотического давления для определения молекулярной массы ..	449
Эффект Доннана	450
Трансмембранная разность pH	452
Поляризация мембраны и мембранный потенциал	453
Установление равновесия по разные стороны мембраны и перенос веществ через биологические мембраны	454
25.3. Мицеллы	454
Образование мицелл	455
Содержимое мицелл	456
Принцип противодействующих сил и образование мицелл	457
Форма и величина мицелл	458
Отношение площади поверхности мицеллы к числу головок	459
Образование бислоев	461
25.4. Структура и функции двойных слоев	462
Данные рентгеноструктурного анализа	462

Влияние холестерина на упорядочение цепей	464
Данные ЭПР	465
Изучение с помощью ЭПР перемещений фосфолипидных молекул между по- верхностями бислоя	466
Использование спектра ЭПР для изучения латеральной диффузии в мембранах	468
Переход порядок — беспорядок в фосфолипидных бислоях	470
Изгибание алифатических цепей внутри бислоя	472
Проникновение воды под поверхность бислоя	474
Спектры протонного магнитного резонанса и спектры ЯМР на ядрах ^{13}C	476
Различия в относительной подвижности отдельных участков липидных моле- кул в бислое	477
Микросреда внутри бислоя	479
Некоторые общие соображения относительно структуры бислоев	479
Краткие выводы	480
Задачи	481
Литература	482
Приложение А. Основы матричной алгебры	484
Приложение Б. Решение задач	488
Предметный указатель	502
Список используемых в книге обозначений	519

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1 Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Чарлз Р. Кантор, Пол Р. Шиммел

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том III

Научные редакторы Н. Н. Шафрановская, Т. И. Пономарева

Мл. редактор О. А. Горгун

Художник Б. А. Шляпугин

Художественный редактор Л. М. Кузнецова

Технический редактор Л. А. Тихомирова

Корректор Т. Е. Луганова

ИБ № 3075

Подписано к печати 22.02.85 г.

Формат 70 × 100¹/₁₆. Бумага офсетная № 1.

Гарнитура таймс. Печать офсетная.

Объем 16,75 бум.л. Усл.печ.л. 43,55.

Усл.кр.-отт. 82,55. Уч.-изд.л. 42,93.

Изд. № 4/1932. Тираж 8300 экз. Зак. 43.

Цена 3 р. 50 к.

Набрано в издательстве «Мир» на фотонаборном комплексе «Компьюграфик»

129820, ГСП Москва, 1-й Рижский пер., 2

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете
СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.

143200, Можайск, ул. Мира, 93.